



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E
SAÚDE PÚBLICA

VIVIANE LOPES ROCHA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UM SUPOSTO GENE RESPONSÁVEL
PELA SÍNTESE DE SIDERÓFORO EM *Mycobacterium massiliense*, EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE DISPONIBILIDADE DE FERRO.**

Goiânia

2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

| | | | |
|--|--|------------------------------|--------------------------|
| Autor (a): | Viviane Lopes Rocha | | |
| E-mail: | viviane IPTSP@hotmail.com | | |
| Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? | <input checked="" type="checkbox"/> Sim | <input type="checkbox"/> Não | |
| Vínculo empregatício do autor | Universidade Federal de Goiás | | |
| Agência de fomento: | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás | Sigla: | FAPEG |
| País: | Brasil | UF:GO | CNPJ: 08.156.102/0001-02 |
| Título: | Avaliação da expressão de um suposto gene responsável pela síntese de sideróforo em <i>Mycobacterium massiliense</i> , em diferentes condições de disponibilidade de ferro | | |
| Palavras-chave: | micobactéria, sideróforo, micobactina | | |
| Título em outra língua: | Evaluation of the expression of a putative gene responsible for the synthesis of siderophore in <i>Mycobacterium massiliense</i> under different conditions of iron availability | | |
| Palavras-chave em outra língua: | Mycobacteria, siderophore, mycobactin | | |
| Área de concentração: | Microbiologia | | |
| Data defesa: | 21/05/2014 | | |
| Programa de Pós-Graduação: | Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública | | |
| Orientador: | Prof. Dr. André Kipnis | | |
| E-mail: | andre.kipnis@gmail.com | | |
| Co-orientador (a): | Profª Drª Ana Paula Junqueira-Kipnis | | |
| E-mail: | apkipnis@gmail.com | | |

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 06 / 11 / 2014

Viviane Lopes Rocha

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

VIVIANE LOPES ROCHA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE UM SUPOSTO GENE RESPONSÁVEL
PELA SÍNTESE DE SIDERÓFORO EM *Mycobacterium massiliense*, EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE DISPONIBILIDADE DE FERRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título de
Mestre em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Dr André Kipnis

Co-orientadora: Dr^a Ana Paula Junqueira Kipnis

Goiânia

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)

Rocha, Viviane Lopes.

Avaliação da expressão de um suposto gene responsável pela síntese de sideróforo em *Mycobacterium massiliense*, em diferentes condições de disponibilidade de ferro [manuscrito] / Viviane Lopes Rocha. - 2014.

93 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis; Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Junqueira-Kipnis

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública
da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: VIVIANE LOPES ROCHA

Orientador: Profº Dr. ANDRÉ KIPNIS

Co-orientadora: Profª Drª ANA PAULA JUNQUEIRA KIPNIS

Membros:

1. Profº Dr. André Kipnis

2. Profª Drª Maria Cláudia Dantas Porfírio Borges André

3. Profª Drª Juliana Lamaro Cardoso

Data: 21/05/14

Àquela que foi a primeira pessoa a me incentivar a encarar o desafio do mestrado , que foi a primeira a enxergar em mim uma possível pesquisadora e que me abriu as portas para que eu pudesse dar início à minha carreira científica.

Àquela que desde o início foi, para mim, um exemplo de mãe, esposa , pesquisadora e professora à ser seguido.

Prof^a Ana Paula Junqueira-Kipnis, obrigada por tudo. Sem você esta dissertação não existiria e eu não estaria tão feliz, fazendo o que descobri que realmente amo fazer: ensinar e aprender.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve guiando meus passos e conduzindo minhas decisões. A Ele que me permite ser alegre em meus momentos bons, que me permite aprender com meus momentos ruins, que me segura sempre que estou prestes a cair e, acima de tudo, que me deu uma vida repleta de bênçãos e oportunidades.

Aos meus pais, que são a razão de cada palavra escrita aqui, de cada passo dado, de cada uma das conquistas que realizei até hoje. Leonel e Vilma, as duas pessoas que muito mais que apenas me colocarem neste mundo, me ensinaram a vencer e estiveram sempre de mãos dadas comigo, um de cada lado, me dando o amor, a força e o discernimento que eu precisava pra aprender a lutar minhas batalhas. Pai, obrigada. Mãe, obrigada.

À minha irmã Vanessa, por ser sempre tão companheira, tão amiga, tão linda... Mas, principalmente, por ter sido meu esteio quando, durante esta jornada, enfraqueci e imaginei que não conseguiria. Ela, no entanto, foi meu amparo e meu impulso, e me mostrou que eu precisava ter força e fé, que seria possível superar. E foi. Irmã, obrigada!

À Vicky e à Barbie, minhas shitzus, que não sabem falar e muito menos ler mas que eu não poderia deixar de citar aqui. Elas foram minhas companheiras em inúmeros momentos que fiquei sozinha escrevendo e, sem a companhia e sem o amor que elas me dedicam, teria sido muito mais difícil.

Ao meu companheiro, André França Corrêa, por ter sido parte fundamental na construção desta dissertação. Me deu a paz e a tranquilidade que eu precisava para superar os momentos de inquietude e ansiedade e o carinho e o amor que me fizeram acreditar em mim e transpor os obstáculos que foram surgindo ao longo do caminho. E, além de tudo isso, contribuiu inúmeras vezes com seu conhecimento científico, exercendo brilhantemente seu papel de pesquisador.

Ao meu orientador, prof^o Dr. André Kipnis, por todos os ensinamentos, pela oportunidade de estar realizando este trabalho, por toda a paciência nos momentos mais complicados e por toda a compreensão nos momentos que errei. Obrigada professor, por todas as vezes que o senhor me deixou caminhar e descobrir as coisas

por mim mesma. Hoje vejo que, se não fosse desta forma, eu não teria tanto conhecimento e tanta confiança de que o que eu aprendi não será esquecido.

À minha co-orientadora prof^a Ana Paula Junqueira-Kipnis, por toda a colaboração neste trabalho mas, principalmente, por toda a compreensão e paciência nos momentos em que deixei de me dedicar à minha função de técnica de seu laboratório por estar me dedicando à esta dissertação. Obrigada por me animar em todas as vezes que algum experimento não saia como eu imaginava que seria, por me ensinar a me portar, a agir e, principalmente a pensar como uma pesquisadora.

Aos meus amigos e amigas, por compreenderem minha ausência no período em que estive realizando este trabalho e, acima de tudo, por estarem sempre me dizendo “Calma, vai dar certo!”, “Força, tá acabando!”, “Você vai conseguir, você sempre conseguiu!”... Dani, Tati, Carla, Maysa, Nati, Régis... Obrigada meus amores! Minha vida não seria tão feliz sem vocês. Em especial, quero deixar um obrigado imenso ao meu amigo Renato Beilner Machado, que me ajudou várias e várias vezes neste trabalho! Sem ele eu não teria conseguido driblar minha dupla jornada de aluna e funcionária.

À minha orientanda de Pivic, Beatriz Cristina, que também foi peça essencial na construção desta dissertação, contribuindo na realização de muitos dos experimentos realizados. Obrigada Bia! Sua ajuda foi decisiva para que tudo terminasse bem.

Aos meus amigos dos laboratórios de “Imunopatologia das Doenças Infecciosas” e “Bacteriologia Molecular”, pela companhia de todos os dias, que sempre tornou o trabalho mais agradável e mais produtivo. Obrigada por todas as sugestões, por todos os ensinamentos e por todos os entendimentos, acima de tudo.

*Além do aprendizado científico, preciso deixar aqui registrado o maior ensinamento que tive durante a realização desta dissertação: Aprendi que **não há nada que possa ser feito sozinho e toda realização não depende apenas de nós mesmos mas sim, e principalmente, da colaboração do próximo.***

Para a realização de vários dos experimentos desta dissertação precisei contar com o auxílio de pessoas que não hesitaram em me ajudar por nenhum instante. Algumas eu já conhecia, outras tive o prazer de conhecer.

Mirelle, minha companheira de graduação, que me ensinou e me ajudou a realizar a técnica com o meio O-CAS para a visualização de sideróforos. Obrigada!

Guilherme, mestre pela Universidade de Brasília, que me ensinou a fazer todas as análises in silico realizadas neste trabalho e que sempre esteve disponível quando precisei esclarecer as dúvidas que foram surgindo. Obrigada!

Ao profº Cirano e ao seu aluno Andrei, por terem me recebido tão bem em seu laboratório quando o equipamento de PCR em tempo real do IPTSP estragou e o profº Cirano não hesitou em permitir que eu utilizasse o mesmo equipamento que ele tem em seu laboratório.

À todos vocês meu obrigada do tamanho do infinito! Este trabalho tem um pedacinho de cada um de vocês.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| Tabelas, figuras e anexos | xii |
| Siglas e abreviaturas | xv |
| Resumo | xvii |
| Abstract | xviii |
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 O gênero <i>Mycobacterium</i> | 1 |
| 1.1.1 <i>Mycobacterium massiliense</i> | 3 |
| 1.2 O ferro e sua importância para o metabolismo..... | 8 |
| 1.2.1 O ferro e sua importância para as micobactérias..... | 11 |
| 2 Justificativa | 23 |
| 3 Objetivos | 26 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 26 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 26 |
| 4 Métodos | 27 |
| 4.1 Isolados de <i>M. massiliense</i> | 27 |
| 4.2 Reativação da cepa GO06..... | 27 |
| 4.3 Sequenciamento da cepa GO06..... | 28 |
| 4.3.1 Cultivo de <i>M. massiliense</i> em <i>Mueller Hinton</i> | 28 |
| 4.3.2 Extração de DNA de <i>M. massiliense</i> | 28 |
| 4.3.3 Amplificação da ORF 9522 de <i>M. massiliense</i> | 29 |
| 4.3.4 Purificação do produto de PCR | 29 |
| 4.3.5 Amplificação do produto de PCR para posterior sequenciamento..... | 29 |
| 4.4 Ensaio O-CAS..... | 31 |
| 4.5 Anotações genômicas..... | 32 |
| 4.6 Crescimento de <i>M. massiliense</i> em meio mínimo..... | 32 |
| 4.7 Leitura das densidades óticas..... | 33 |
| 4.8 Crescimento de <i>M. massiliense</i> em meio mínimo para posterior extração de RNA..... | 33 |
| 4.8.1 Coleta de células para extração de RNA..... | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.9 | Extração de RNA..... | 34 |
| 4.10 | Síntese de cDNA..... | 35 |
| 4.11 | Avaliação da expressão de <i>smbtb in vivo</i> | 35 |
| 4.11.1 | Geração de bolsões de ar nos camundongos..... | 36 |
| 4.11.2 | Infecção dos camundongos..... | 37 |
| 4.11.3 | Eutanásia dos camundongos e lavado dos bolsões de ar..... | 37 |
| 4.12 | Realização de PCR em tempo real..... | 38 |
| 4.13 | Análise da expressão gênica..... | 39 |
| 5 | Resultados | 40 |
| 5.1 | Sequenciamento da ORF 9522 de GO06..... | 40 |
| 5.2 | Ensaio O-CAS..... | 40 |
| 5.3 | Anotações genômicas..... | 42 |
| 5.4 | Avaliação do crescimento de <i>M. massiliense</i> em diferentes concentrações de ferro..... | 44 |
| 5.5 | Avaliação da expressão de <i>smbtb in vitro</i> | 45 |
| 5.6 | Avaliação da expressão de <i>smbtb in vivo</i> | 51 |
| 6 | Discussão | 56 |
| 7 | Conclusões | 64 |
| 8 | Referências Bibliográficas | 65 |
| 9 | Anexos | 73 |

TABELAS E FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Exemplos representativos de diferentes sideróforos e seus organismos produtores | 13 |
| Figura 2. Enzimas da maquinaria ribossomal para a produção de peptídeos e proteínas e enzimas básicas do sistema não- ribossomal..... | 15 |
| Figura 3. Representação estrutural, a partir do gene, da estrutura de módulos e domínios observada em um NRPS | 16 |
| Figura 4. Sideróforo de <i>M. tuberculosis</i> | 17 |
| Figura 5. Provável sistema de montagem das micobactinas..... | 18 |
| Figura 6. Esquema de transporte de ferro feito pelas carboximicobactinas..... | 21 |
| Figura 7. Esquema de formação dos bolsões de ar..... | 36 |
| Figura 8. Mapa de distribuição das ORFs mbtA-G de <i>M. massiliense</i> e <i>M. tuberculosis</i> | 42 |
| Figura 9. Avaliação do crescimento de <i>M. massiliense</i> em diferentes concentrações de Fe..... | 43 |
| Figura 10. Ensaio O-CAS..... | 44 |
| Figura 11. Curva de amplificação da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene <i>smbtb</i> , para o gene 16S..... | 46 |
| Figura 12. Curva de <i>Melting</i> da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene <i>smbtb</i> , para o gene 16S | 47 |
| Figura 13. Curva de amplificação da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene <i>smbtb</i> , para o gene <i>smbtb</i> | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Curva de <i>Melting</i> da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene <i>smbtb</i> , para o gene <i>smbtb</i> | 49 |
| Figura 15. Expressão relativa de <i>smbtb</i> em diferentes concentrações de ferro e em diferentes momentos do crescimento de <i>M. massiliense in vitro</i> | 50 |
| Figura 16. Curva de amplificação da PCR em tempo real realizada para o gene 16S, utilizando os cdnas sintetizados a partir dos RNAs extraídos das células do lavado da bolha de ar dos camundongos..... | 51 |
| Figura 17. Curva de <i>Melting</i> obtida na amplificação dos cdnas sintetizados a partir dos RNAs extraídos das células da bolha de ar dos camundongos para o gene 16S..... | 52 |
| Figura 18. Curva de amplificação da PCR em tempo real realizada para o gene <i>smbtb</i> , utilizando os cDNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos das células do lavado do bolsão de ar dos camundongos utilizados no experimento <i>in vivo</i> deste estudo..... | 53 |
| Figura 19. Curva de <i>Melting</i> obtida na amplificação dos cDNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos das células do lavado da bolha de ar dos camundongos para o gene <i>smbtb</i> | 53 |
| Figura 20. Expressão relativa de <i>smbtb</i> em camundongos C57 submetidos à tratamentos de depleção ou suplementação com ferro..... | 54 |
| Figura 21. Ensaio O-CAS..... | 59 |
| Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento da ORF 9522 de <i>Mycobacterium massiliense</i> | 30 |
| Tabela 2. Porcentagem de similaridade encontrada entre a sequência de nucleotídeos de cada suposta ORF de <i>M. massiliense</i> para os genes <i>mbtA-G</i> e a sequência de nucleotídeos destes mesmos genes, já descritos em cada uma das micobactérias analisadas..... | 39 |

Tabela 3. Porcentagem de similaridade encontrada entre a sequência de aminoácidos de cada suposto peptídeo codificados pelos supostos genes mbtA-G de *M. massiliense* com a sequência de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes mbtA-G já descritas em cada uma das micobactérias analisadas..... 40

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Bfr- Bacterioferritina

BCG Δ *mbtb*- BCG com *mbtb* deletado

CAS - *Chrome azuro* S

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CMTB- Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

DDH- Hibridização DNA-DNA

DO- Densidade ótica

PFGE- Eletroforese em gel de campo pulsado, do inglês “Pulsed-field gel electrophoresis”

erm- Gene da eritromicina metilase ribossomal

Fe²⁺-íon ferroso

Fe³⁺-íon férrico

Ftn- Ferritina

Hb- hemoglobina

hsp65-gene da proteína de choque térmico de 65kDA

MCR-Micobactéria de crescimento rápido

MNT-Micobactéria não causadora de tuberculose

ORF- Fase aberta de leitura do inglês: “open reading frame”

PKS- Policetídeos sintases, do inglês “Polyketide Synthase”

ideR- Proteína Reguladora Dependente de Ferro, do inglês “Iron-dependent gene expression”

NRPS- Peptídeos sintases não-ribossomais, do inglês “Non-ribosomal peptide synthetases”

rRNA- RNA ribossomal

ITS- Sequência espaçadora dos transcritos, do inglês “internal transcribed spacer”

smbtb- suposto gene *mbtb* de *Mycobacterium massiliense*

$\Delta\Delta$ Ct- método delta-delta Ct.

RESUMO

Mycobacterium massiliense (MM) tem sido associado como agente causador de vários surtos nosocomiais relacionados à laparoscopia, artroscopia e infecções de feridas. Inúmeros surtos têm sido reportados no Brasil. As cidades de Goiânia, Rio de Janeiro e Belém apresentaram um alto número de casos em 2006 e 2007. O íon ferro é extremamente importante para vários processos bioquímicos em todos os organismos e, no caso dos microrganismos, para o sucesso da infecção. Para auxiliar a captação de Fe durante este processo, os microrganismos sintetizam moléculas chamadas sideróforos, que desempenham esta função. Micobactina e carboximicobactina são os sideróforos que já foram descritos em micobactérias. Um dos genes responsáveis pela síntese dos sideróforos em *M. tuberculosis* é o *mbtb*. Um isolado de MM, com origem no surto que aconteceu em Goiânia (MM GO06) teve seu genoma sequenciado e sua análise revelou que esta espécie possui um gene putativo com alta similaridade com o *mbtb* de *M. tuberculosis*, o que poderia indicar que MM também sintetiza sideróforos e que esta molécula poderia estar auxiliando esta micobactéria a instalar a infecção no hospedeiro. Sabemos que a ausência do gene *mbtb* em *M. tuberculosis* torna esta micobactéria incapaz de sintetizar sideróforos. Avaliar se um gene similar ao *mbtb* e com a mesma função está presente em MM (*smbtb*) irá auxiliar o entendimento dos mecanismos de infecção de MM e a descoberta de novos alvos para drogas para o tratamento de infecções causadas por MM. RNA total foi obtido de culturas onde MM foi crescido em diferentes concentrações de ferro. Realizou-se Real Time PCR para o gene *smbtb* a fim de avaliar a expressão deste gene durante o crescimento bacteriano em cada condição. A expressão do *smbtb* aumentou com o aumento da disponibilidade de ferro. Estudos *in vivo* com camundongos suplementados ou privados do íon ferro apresentaram um perfil de expressão diferente daquele obtido nos estudos *in vitro*. Em camundongos, MM expressou *smbtb* em altos níveis nos animais que foram tratados com quelante para o íon ferro. Evidenciamos então, que *smbtb* pode estar envolvido na captação de ferro tanto para armazenamento deste íon, quando o mesmo está disponível, quanto para a utilização imediata no metabolismo da bactéria, quando há uma baixa disponibilidade de ferro no ambiente que MM se encontra.

ABSTRACT

Mycobacterium massiliense (MM) has been associated as the causative agent of many nosocomial outbreaks related to laparoscopy, arthroscopic and wound infections. Several outbreaks have been reported in Brazil. The cities of Goiânia, Rio de Janeiro and Belem reported a high number of cases in 2006 and 2007. The iron ion (Fe) is extremely important for many biochemical processes in all organisms and, in the case of microorganisms, the success of the infection. Microorganisms synthesize molecules called siderophores (SD) to aid Fe uptake. Micobactin and carboximicobactin are the SDs that has been described in mycobacteria. One of the genes responsible for the assembly of these SD in *M. tuberculosis* is the *mbtb*. A MM strain, which belongs to the outbreak that happened in Goiânia (MM GO06) had its genome sequenced and the analysis revealed that the species has a putative gene with high similarity to *M. tuberculosismbtb*, which could be an indication that MM also synthesizes a siderophore molecule and that this can be helping this mycobacteria to install the infection in the host. It is known that in the absence of *mbtb* gene *M. tuberculosis* do not synthesize their SD. To estimate whether a gene similar to *mbtb* and with the same function is present in MM (*smbtb*) will assist in the understanding of the infection mechanisms of MM and discover new drug targets for treating infections with this microorganism. Total RNA was obtained from cultures grown at different concentrations of Fe. Real time PCR was performed targeting the *smbtb* to evaluate the expression of this gene during bacterial growth in each condition. The expression of *smbtb* was higher with the increase of the availability of iron. *In vivo* studies with mice supplemented with or chelated from iron showed expression profile of *smbtb* different from those obtained in *in vitro* studies. In mice, *M. massiliense smtb* expressed at higher levels when the animal were treated for iron depletion. Thus, we have evidence that *smbtb* is involved in iron uptake both for subsequent storage, when this ion is available, and for prompt use in the metabolism of the bacteria when it is not in an environment where there is availability of this ion.

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

1.1 O Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae* (o único gênero desta família), ordem Actinomycetales e se caracteriza como bacilos delgados, levemente curvados ou retos, com tamanho de 0,2 a 0,4 μ m por 2 a 4 μ m. São microrganismos aeróbicos, embora algumas espécies possam crescer em ambientes com baixa concentração de oxigênio, imóveis e não formadores de esporos (VOSSLER, 2000).

As micobactérias apresentam uma parede celular complexa, constituída por 60% de lipídeos, como ácidos micólicos e micosídeos, e por polipeptídeos. Sua camada externa de ácidos micólicos específicos ligados ao açúcar arabinogalactano formam o complexo micolil-arabinogalactano. Esse complexo impermeabiliza a superfície da micobactéria, tornando-a bastante resistente a compostos hidrofílicos e à dessecação, além de dificultar a captação de nutrientes, retardando o seu crescimento (CORNER, 1994).

As micobactérias apresentam uma importante característica morfo-tintorial, a álcool-ácido resistência, conferida pelas moléculas de ácido micólico-arabinogalactano (KONEMAN et al., 2001; NOLTE; METCHOCK, 1995). Esta denominação refere-se aos princípios das técnicas que são, em geral, utilizadas para corar estas bactérias já que, embora classificadas como Gram-positivas, as micobactérias não são coradas pela coloração de Gram, mas pelos métodos de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun. Ambas as técnicas utilizam a carbolfucsina, que confere coloração vermelha às micobactérias. Após o emprego deste primeiro corante, as micobactérias são submetidas a descoloração com solução álcool-ácido e são capazes de resistir à este procedimento. Este fato justifica a designação de “bacilos álcool-ácido resistentes”, pois resistem ao descoloramento subsequente com solução álcool-ácido (GUTIERREZ et al., 2001; ROSEMBERG; TARANTINO, 2002).

O gênero *Mycobacterium* é constituído pelo *M. leprae*, pelas espécies que compõem o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e outras micobactérias denominadas micobactérias não causadoras de tuberculose (MNT) (BROSCH et al., 2002; MARMIESSE et al., 2004). Este gênero compreende mais de 100 espécies sendo que, no CMTB, estão agrupadas as espécies com potencial patogênico e maior importância médica: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. Canettii*, *M. bovis* BCG (Bacilo Calmette Guérin), *M. microti* e *M. pinnipedii* (COUSINS, 2003). O *M. leprae*, apesar de ser patogênico, não faz parte deste complexo.

As micobactérias podem ser classificadas de acordo com o tempo de crescimento em rápido ou lento. Micobactérias de crescimento rápido (MCR), as quais são caracterizadas por visível crescimento em meio artificial sólido em até sete dias, são organismos ambientais ubíquos que estão sendo cada vez mais caracterizados como importantes patógenos humanos (COLOMBO; OLIVIER, 2008). MCR são usualmente consideradas saprófitas e têm sido recuperadas do meio ambiente, particularmente da poeira, solos aguados e sistemas de distribuição de água (KATOCH, 2004).

A maioria dos pacientes suscetíveis às MNT, como as MCR, são pessoas que se encontram em um estado imunocomprometido, que apresentam alguma imunodeficiência ou são portadoras de patologias relacionadas ao pulmão como bronquiectasias (CHOI et al., 2012). Recentemente, todavia, relatos de infecções causadas por MCRs em pessoas imunocompetentes têm crescido acentuadamente (CARDOSO et al., 2008; KIM et al., 1999; KWON et al., 2009).

Em 2012, Choi et al descreveram um caso de infecção pulmonar causada por *M. massiliense* no qual o paciente não respondeu à terapia antimicrobiana aplicada (claritromicina, amicacina e imipenem) e evoluiu ao óbito. O paciente, no entanto, não apresentava nenhum imunocomprometimento, não era fumante e não apresentou relato de nenhuma história específica de doença crônica.

As MCR são descritas como raros patógenos oportunistas em infecções nosocomiais e pseudo-surtos e devem, portanto, serem consideradas como um importante grupo de bactérias que apresenta importância patológica crescente. Doenças causadas por MCR variam entre infecções associadas a assistência médica, infecções de

feridas, doenças cutâneas disseminadas, infecções dos ossos e das articulações, queratites, doenças pulmonares e outras infecções (KATOCH, 2004).

Algumas cepas de MCR têm sido descritas como sendo capazes de desenvolver biofilme sendo que, infecções relacionadas a biofilmes representam mais de dois terços de todas as infecções causadas por estes organismos (ESTEBAN et al., 2008). Entre as espécies de MCR de maior importância, *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum* têm sido frequentemente associadas a doenças e, em especial, à infecções de feridas pós-traumáticas, numa variedade de contextos clínicos (KATOCH, 2004).

1.1.1 *Mycobacterium massiliense*

Recentemente, duas novas espécies relacionadas à *M. abscessus* foram identificadas, *M. massiliense* e *M. bolletii*, as quais eram identificadas anteriormente como *M. abscessus* (ADÉKAMBI; DRANCOURT, 2004; ADÉKAMBI et al., 2006). Adekambi e Drancourt propuseram, em 2004, a diferenciação de *M. massiliense* de *M. abscessus* e *M. bolletii*, ao perceberem, através de testes moleculares que, apesar de não se diferenciarem muito fenotipicamente, *M. massiliense* apresentava uma similaridade em torno de 95% para os genes *hsp65*, *sodA* e *recA* com *M. abscessus* e *M. bolletii*. Alguns pares de bases se diferenciavam entre si em cada um desses genes. Baseado no conceito de que organismos que se diferem em suas sequências gênicas acima de 3% devem ser considerados espécies distintas, Adekambi e Drancourt (2004) propuseram que fosse criada a nomenclatura de uma nova espécie, e esta se chamaria *M. massiliense* (ADÉKAMBI; DRANCOURT, 2004).

A identificação de membros do complexo *M. abscessus* a nível de espécies depende da análise da sequência de vários genes, incluindo o gene da eritromicina metilase ribossomal (*erm*), o gene do RNA ribossomal (rRNA) 23S e vários *housekeeping* genes, como o gene da beta subunidade da RNA polimerase (*rpoB*) e o gene da proteína de choque térmico de 65kDA (*hsp65*) (ADÉKAMBI et al., 2006; CHADHA et al., 1998; CONVILLE; WITEBSKY, 1998).

Mycobacterium massiliense foi isolada pela primeira vez do escarro de um paciente com pneumonia, em Marselha, na França, em 2004 (ADÉKAMBI; DRANCOURT, 2004). A espécie *Mycobacterium massiliense* foi proposta naquele

mesmo ano e teve o nome validado em 2006. Posteriormente a estas publicações, *M. massiliense* foi detectado como causa de infecções invasivas de dois pacientes, e citado como um patógeno emergente. A correta descrição desta espécie como um patógeno humano comum e sua importância epidemiológica tem sido, possivelmente, prejudicada pela identificação incorreta de cepas de *M. massiliense* ao longo dos anos, especialmente devido as altas similaridades fenotípicas e genotípicas entre isolados de *M. massiliense* e o grupo *M. chelonae* - *M. abscessus* (SIMMON et al., 2007; VIANA-NIERO et al., 2008).

Leao et al (2011) propuseram que as espécies *M. massiliense* e *M. bolletii* fossem agrupadas à espécie *M. abscessus* (LEAO et al., 2011). Apesar desta sugestão, o estudo de Bryant et al (2013) analisou, por técnicas de sequenciamento, estas três espécies e mostrou que, apesar da média de similaridade entre elas ser de 99,1%, há grandes e importantes diferenças genômicas entre *M. abscessus*, *M. massiliense* e *M. bolletii* e, devido a isso, fica claramente comprovado que o agrupamento sugerido não pode ser realizado (BRYANT et al., 2013).

Epidemiologicamente, *M. massiliense* se apresenta como um patógeno emergente nos Estados Unidos (SIMMON et al., 2007; ZELAZNY et al., 2009) e, no Brasil, onde surtos estão sendo associados com procedimentos cosméticos e pós-cirúrgicos (CARDOSO et al., 2008; DUARTE et al., 2009; VIANA-NIERO et al., 2008).

Com relação ao Brasil, o primeiro surto significativo de *M. massiliense* foi descrito na cidade de Belém, estado do Pará, região norte, de 2004 a 2005. Cinquenta e oito isolados de *M. massiliense* foram recuperados de pacientes confirmados submetidos a cirurgias laparoscópicas. Estes indivíduos apresentaram hiperemia local, formação de abscesso com aspectos inflamatórios, pus ou secreções purulentas e outros sinais clínicos, e não responderam a terapia antimicrobiana comum (VIANA-NIERO et al., 2008).

Desde então, uma série de surtos nosocomiais relacionados à infecções de feridas têm sido notificados em vários estados brasileiros. Estes incluem, pelo menos, os estados do Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (ANVISA, 2007; CARDOSO et al., 2008).

Na cidade de Goiânia, no estado de Goiás, foi relatado um dos surtos mais significantes associado a procedimentos cirúrgicos por laparoscopia e artroscopia em vários hospitais, onde as infecções foram causadas por *M. massiliense*. Cardoso et al iniciaram os estudos desse surto em 2005 com o recrutamento de pacientes, que foi realizado até meados de 2007 (CARDOSO et al., 2008). Nesse período, foram relatados 121 casos de infecções causadas por MCR. Dos pacientes recrutados, apenas 18 concordaram em participar do estudo e as amostras isoladas destes foram identificados como *M. massiliense* por sequenciamento parcial dos genes *hsp65* e *rpoB*.

De 2006 a 2007, uma epidemia (1051 casos reportados) de infecções pós-cirúrgicas relacionadas à MCR no estado do Rio de Janeiro, foi relatada pelo Ministério da Saúde. Dos casos de pacientes confirmados submetidos à cirurgia vídeo laparoscópica durante este período de tempo 148 isolados de MCR foram recuperados e caracterizados onde, destes 148, 144 isolados foram confirmados, por sequenciamento do gene *rpoB*, trataram-se de *M. massiliense* (DUARTE et al., 2009).

Em 2009, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) divulgou uma nota técnica conjunta sobre os números de infecções causadas por micobactérias de crescimento rápido relatando os casos reportados entre janeiro de 2003 e 28 de fevereiro de 2009. Nesta nota, as infecções causadas por *M. massiliense* somam um total de 2128 casos de infecções, reportadas em hospitais públicos e privados, clínicas de cirurgia plástica, oftalmológicas, de acupuntura e de estética. Destes casos, a maioria deles se encontra no estado do Rio de Janeiro (1107 casos), Pará (327 casos), Espírito Santo (363 casos) e São Paulo (193 casos).

Infecções causadas por *M. massiliense* são frequentes nos países asiáticos. Na Coreia, um surto foi relacionado a injeções intramusculares de agentes antimicrobianos (KIM et al., 2007). Entre isolados pulmonares pertencentes ao grupo *M. abscessus*, quase metade dos isolados na Coreia foram identificados como *M. massiliense* (KIM et al., 2008; VAN INGEN et al., 2009). Recentemente, entre 2012 e 2014, casos de infecções causadas por *M. massiliense* têm sido novamente reportadas nos países asiáticos sendo que o caso reportado por Hamamoto et al, em 2012, evoluiu ao óbito do paciente (CHOI et al., 2013; HAMAMOTO et al., 2012; JUNG et al., 2014).

Diversos estudos têm mostrado que os isolados de *M. massiliense* que têm circulado pelo Brasil e sido responsável pelos vários surtos já ocorridos, tratam-se de um clone já que isolados obtidos de vários destes surtos, como aqueles ocorridos em Belém, Rio de Janeiro e Goiás, apresentaram perfis genéticos idênticos, analisados pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês “*pulsed field gel electrophoresis*”). Este clone foi denominado BRA100 e têm sido responsável, principalmente, por infecções pós-cirúrgicas, causando lesões como abscessos superficiais e granulomas. Além disso, já foi observado também que a cepa BRA100 é resistente às soluções comerciais de glutaraldeído a 2%, utilizadas, em geral, em processos de esterilização de instrumentos cirúrgicos (MONEGO et al., 2004).

Os isolados dos 18 pacientes do estudo de Cardoso et al, realizado em 2008, apresentaram padrões de PFGE idênticos àqueles obtidos dos isolados do surto ocorrido em Belém (VIANA-NIERO et al., 2008). Esta análise confirma que o isolado de *M. massiliense* responsável pelas infecções ocorridas durante o surto em Goiânia (2005-2008) trata-se do clone BRA100.

Uma vez que abordagens terapêuticas comumente usadas para tratar infecções cutâneas não são efetivas contra MCR, a suspeita clínica prévia e o diagnóstico precoce são fatores chave na redução da morbidade. Microrganismos causadores dessas infecções devem ser corretamente identificados a nível de espécie, e os clínicos devem estar atentos da susceptibilidade destes microrganismos para os agentes antimicrobianos já que o esquema de tratamento e a conduta a ser tomada são diretamente afetados pelos resultados obtidos com esses agentes. Como foi dito anteriormente, *M. massiliense* é estritamente relacionado a *M. abscessus* e *M. chelonae*, mas estes grupos apresentam diferenças em sua susceptibilidade aos antimicrobianos (CHO et al., 2010).

Infecções causadas por *M. massiliense*, na maioria das vezes são tratadas erroneamente desde o início, o que retarda a cura da infecção e traz inúmeros efeitos colaterais, que seriam desnecessários ao paciente, devido ao uso de antimicrobianos incorretos. Um equívoco que ocorre frequentemente, é o tratamento de infecções causadas por *M. massiliense* com as mesmas drogas usadas para o tratamento da tuberculose que se trata, basicamente, de um esquema composto por rifampicina, isoniazida e etambutol (CHEN et al., 2014). Hamamoto et al (2012) relataram um caso de bacteremia causada por *M. massiliense* que foi, inicialmente, tratado com drogas anti-tuberculose e só depois de alguns dias o esquema terapêutico foi modificado.

Outro equívoco que ocorre frequentemente em casos de infecção causada por *M. massiliense* é a instauração de um tratamento antimicrobiano para *M. abscessus*. Kobashi et al (2011) reportaram um caso de doença pulmonar causada por *M. massiliense* que evoluiu para septicemia, onde o paciente acabou indo a óbito. Neste caso, o paciente também foi tratado inicialmente com drogas antituberculose, no entanto, esta terapia foi mudada quando se observou o rápido crescimento da bactéria em cultura e suspeitou-se de infecção por *M. abscessus*. O tratamento instaurado então, consistia de claritromicina, amicacina, imipenem/cilastatina e levofloxacina. Somente após a análise genotípica do RNA ribossomal 16S, dos genes *hsp65* e *rpoB* e da sequência espaçadora dos transcritos (ITS) 16S-23S, é que *M. massiliense* foi identificado como espécie causadora da infecção. Realizou-se, então, um teste de sensibilidade aos antimicrobianos para *M. massiliense*, onde a bactéria apresentou elevados valores de concentração inibitória mínima (CIM) para a maioria das drogas antimicrobianas testadas ($16 > \text{CIM} > 128 \mu\text{g/mL}$). O isolado foi sensível apenas a claritromicina. Todavia, o paciente apresentou baixa resposta clínica e faleceu por falência respiratória uma semana após o início da terapia adequada (KOBASHI et al., 2011).

A resistência induzível à claritromicina tem sido sugerida como uma explicação para a ausência de eficácia nos tratamentos com apenas este antimicrobiano em infecções causadas por *M. abscessus*. O gene *erm* tem sido identificado em vários isolados de *M. abscessus* e a presença deste gene foi associada com resistência induzível à macrolídeos. A indução da resistência foi apresentada como resultado do aumento da expressão de *erm*, como demonstrado por um aumento nos níveis de RNA deste gene após a exposição a macrolídeos (NASH; BROWN-ELLIOTT; WALLACE, 2009).

Um estudo realizado por Koh et al (2009), observou a resistência de isolados de *M. abscessus* e *M. massiliense* à claritromicina. Neste estudo, foram testados 19 isolados de *M. abscessus* e 29 isolados de *M. massiliense*. Os resultados mostraram que todos os isolados de *M. abscessus* desenvolveram, *in vitro*, uma alta resistência à claritromicina (CIMs $> 32 \text{ mg/mL}$) enquanto que todos os 29 isolados de *M. massiliense* se mantiveram suscetíveis à esta droga ao final do mesmo teste (CIMs $< 1 \text{ mg/mL}$).

O que se observa na literatura, em geral, são casos em que infecções causadas por *M. massiliense* são inicialmente tratadas com uma terapia antimicrobiana empírica

para micobactérias em geral e, após um extenso período de tratamento e ausência de melhora dos sintomas clínicos, outras formas de diagnósticos são buscadas e, só então, o diagnóstico correto é conseguido mas, na maioria das vezes, isto não ocorre a tempo de evitar o óbito do paciente.

Outro estudo de Hamamoto et al (2012), relata mais um caso como este, onde um paciente de 58 anos com leucemia mielóide crônica foi admitido no hospital apresentando uma febre muito alta e foi tratado com meropenem por 10 dias. Após esse período, detectou-se que a infecção estava sendo causada por micobactéria e procedeu-se o tratamento com rifampicina, etambutol e claritromicina. Realizou-se, então, um teste pelo método de hibridização DNA-DNA (DDH) o qual detectou *M. abscessus* como o microorganismo causador da infecção. Amicacina foi adicionada ao esquema de tratamento após este diagnóstico. Todavia, o microorganismo causador da infecção foi finalmente identificado como *M. massiliense* por sequenciamento dos genes *hsp65* e *rpoB* e da região ITS 16S-23S do rRNA (HAMAMOTO et al., 2012). Diante desses estudos, pode-se observar que o diagnóstico correto de infecções causadas por *M. massiliense* é de extrema relevância para a aplicação do esquema terapêutico apropriado e para evitar o desenvolvimento de possíveis mecanismos de resistência antimicrobiana.

O primeiro caso de óbito por infecção causada por *M. massiliense* foi documentado na Itália (TORTOLI et al., 2008), onde a paciente havia sido submetida a um transplante renal e havia recebido o diagnóstico de tuberculose pulmonar. Desde então, tem-se visto inúmeros relatos de casos de infecções causadas por *M. massiliense* que evoluíram ao óbito.

M. massiliense tem sido descrito como o principal agente isolado durante recentes surtos causados por MCRs em vários estados brasileiros, principalmente daqueles que ocorreram após 2004 (DUARTE et al., 2009), o que faz desta bactéria um motivo de preocupação para a saúde pública e revela a necessidade de maiores estudos acerca dos mecanismos de infecção e das formas de tratamento de infecções causadas por esta espécie.

1.2 O ferro e sua importância para o metabolismo

O ferro é um dos mais abundantes elementos na face da terra. Ele pode existir em dois estados de oxidação, Fe^{2+} (íon ferroso) e Fe^{3+} (íon férrico), mas em alta

concentração de oxigênio ele está presente exclusivamente na forma de Fe^{3+} , a qual não apresenta boa solubilidade. O íon Fe^{2+} é muito mais solúvel, no entanto, existe apenas em condições anóxicas ou em pH bastante baixo (CHU et al., 2010).

O ferro é um elemento vital para a homeostase celular; é essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e metabolismo energético. Este elemento é um importante cofator para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e para a fixação do nitrogênio. Nos mamíferos, o ferro é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado (WIJAYANTI; KATZ; IMMENSCHUH, 2004).

Existem duas formas em que o ferro pode ser encontrado nos alimentos: a forma heme e a forma não-heme. A forma heme é predominantemente encontrada em carnes e vísceras sob a forma de hemoglobina e mioglobina enquanto que, a forma não-heme, é encontrada em vegetais e seus alimentos derivados. A forma em que o ferro se encontra determina o caminho pelo qual ele será absorvido (GOBIN; HORWITZ, 1996).

O ferro heme se solubiliza nas condições do intestino delgado e é absorvido sem dificuldade pela mucosa do intestino sob a forma ferro porfirina intacta. Quando o ferro se encontra no interior da célula da mucosa, este íon é liberado pela ação da heme-oxigenase e, a partir daí, segue os mesmos caminhos do ferro não-heme (BIANCHI; SILVA; OLIVEIRA, 1992).

Existem três principais proteínas envolvidas na absorção do ferro não-heme. São elas as mucinas, as integrinas e as mobilferrinas. Após a transferência do ferro não-heme da luz intestinal para o citosol a maior parte deste elemento é depositado como ferritina enquanto outras pequenas porções são liberadas para a transferrina ou perdida na descamação das células mucosas (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

Podemos obter o ferro de duas fontes principais: da dieta e da reciclagem de hemácias senescentes. Nos vegetais e cereais encontramos o Fe^{3+} , que constitui o ferro inorgânico enquanto que, na carne vermelha, em ovos e laticínios, encontra-se a forma heme do ferro. A aquisição de ferro na forma heme através da nutrição corresponde a aproximadamente 33% do total e, esta forma de ferro, é proveniente da quebra da hemoglobina e da mioglobina (HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

A absorção do ferro heme é bastante elevada se comparada com a absorção do ferro não-heme devido ao mecanismo absorptivo que apresenta e também ao fato de ser altamente absorvido no pH intestinal. Além disso, a absorção do ferro heme não é alterada por fatores químicos ou alimentares, o que poderia levar a uma queda na disponibilidade deste íon. O ferro não-heme, no entanto, pode ter sua disponibilidade alterada tanto por fatores químicos quanto alimentares. A absorção do ferro heme varia entre 15 a 35%, dependendo do nível das reservas de ferro que o indivíduo possui (COOK et al., 1983). Já a absorção do ferro não-heme é menor, variando entre 1 e 5% e pode variar em amplitudes maiores dependendo de modificações nos fatores químicos e nutricionais (BIANCHI; SILVA; OLIVEIRA, 1992; COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996).

A regulação da absorção de ferro ocorre de acordo com a necessidade deste íon no organismo. Quando há excesso de ferro, essa absorção se encontra diminuída enquanto que, quando há deficiência deste íon a absorção do mesmo é aumentada. O teor de ferritina no citoplasma varia segundo a taxa de ferro plasmático sendo que este é regulado segundo a absorção intestinal deste íon .

A transferrina é uma glicoproteína que transporta ferro (Fe^{3+}), sintetizada e metabolizada principalmente nos hepatócitos. É constituída por uma cadeia polipeptídica de 679 aminoácidos com uma massa molar de 79.500 g/mol e ponto isoelétrico, que pode variar entre 5,4 e 5,9. A transferrina transporta e cede o ferro aos eritroblastos da medula óssea ou a outros tecidos, onde ele ficará armazenado (MOTTA, 2003; DESCHAMPS; MIÑA; DIEGUEZ, 2003). Denomina-se apotransferrina a transferrina que se encontra livre de ferro, desta forma, pode-se definir a transferrina como uma apotransferrina conjugada com Fe^{3+} . Quando a transferrina se liga ao seu receptor específico nas células, o complexo transferrina/receptor é internalizado em um endossomo. Este endossomo então acidifica-se e libera o ferro por sua transferência e redução a íon ferroso. A apotransferrina é, então, transportada até a superfície celular e, neste momento, está novamente apta a transportar outra molécula de ferro para o interior da célula (BURTIS; ASHWOOD; BRUNS, 2008).

Uma importante fonte de ferro é a degradação de hemácias senescentes (25 a 30 mg/dia). A maior parte do ferro no organismo está associada à molécula de hemoglobina (Hb) e a quantidade de ferro reciclado no processo de degradação citado é

suficiente para manter a quantidade de ferro necessária diariamente no processo de eritropoiese (FAIRBANKS; BEUTLER, 2001).

Quando a hemácia entra no estado de senescência, começa a apresentar modificações bioquímicas em sua membrana. Macrófagos da medula óssea, do baço e células de Kupffer (estas em menor quantidade), reconhecem estas modificações como um sinal para que estas hemácias sejam eliminadas. Dá-se, então, o processo de interação entre receptores específicos entre macrófago e hemácia, seguido do processo de fagocitose, que culmina na degradação dos componentes da hemácia (CHUNG; WESSLING-RESNICK, 2003; KNUTSON; WESSLING-RESNICK, 2003)

A deficiência de ferro acarreta conseqüências para todo o organismo, sendo a anemia a manifestação mais relevante. Por outro lado, o acúmulo ou excesso de ferro é extremamente nocivo para os tecidos, uma vez que o ferro livre promove a síntese de espécies reativas de oxigênio que são tóxicas e lesam proteínas, lipídeos e DNA. Portanto, é necessário que haja um perfeito equilíbrio no metabolismo do ferro, de modo que não haja falta ou excesso do mesmo. Essa homeostase vai possibilitar a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evitar possíveis danos teciduais (GROTTO, 2008).

As proteínas ferritina e hemossiderina constituem formas de armazenamento do ferro, enquanto que a transferrina pode ser vista como uma proteína de transporte deste íon. Podemos encontrar ferritina e hemossiderina nas células reticuloendoteliais do fígado, do baço e da medula óssea, exercendo sua função de estocagem do ferro. A ferritina, constitui-se da apoferritina contendo o núcleo férrico, e é a forma solúvel de armazenamento do ferro. Já a hemossiderina constitui a forma degradada da ferritina (FAIRBANKS; BEUTLER, 2001; HOFFBRAND; PETTIT; MOSS, 2006).

1.2.1 O ferro e sua importância para as micobactérias

As bactérias requerem ferro para seu crescimento e sua sobrevivência como todos os outros organismos vivos. Para as bactérias, o ferro também é um elemento essencial para o metabolismo, participando da ativação de diversas enzimas e do transporte de elétrons, além de ser necessário em hidroxilases e oxigenases. Além disso, nas bactérias, o ferro também atua como cofator de diversas enzimas, principalmente

em bactérias patogênicas (RATLEDGE, 2004; RODRIGUEZ; SMITH, 2003; VOSS et al., 1999).

Devido a essa essencialidade do ferro para o perfeito funcionamento do metabolismo bacteriano, estes microrganismos apresentam uma variedade de mecanismos para capturar a forma insolúvel do íon ferro, que é o Fe^{3+} . A capacidade de adquirir o ferro em um hospedeiro é uma característica essencial da maioria dos patógenos mas também representa um desafio devido ao fato de que o ferro não é solúvel na presença de oxigênio e em pH neutro. No contexto de uma bactéria presente em um hospedeiro mamífero, o íon ferro não é encontrado livre e sim, ligado a um firme complexo que possui alta afinidade pelas proteínas do hospedeiro que se ligam ao ferro. Em resposta à este desafio, diversos patógenos têm desenvolvido várias estratégias que os tornam capazes de competir com o hospedeiro pelo ferro e estabelecer a infecção (RODRIGUEZ, 2006).

Um desses mecanismos é a produção de sideróforos, que são moléculas que se ligam (quelantes, em termos químicos) ao ferro com alta afinidade (GUERINOT, 1994). Existe uma grande diversidade de sideróforos sendo que mais de 500 moléculas diferentes são conhecidas (RATLEDGE; DOVER, 2000; WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004), porém todas apresentam a mesma estrutura essencial, que consiste em uma unidade funcional que se liga com moléculas de ferro, como as transferrinas e lactoferrinas por exemplo, e uma cadeia peptídica que interage com um receptor na superfície da membrana bacteriana. A afinidade dos sideróforos consiste em uma das suas mais importantes propriedades. O receptor de sideróforo de uma bactéria pode, em geral, reconhecer apenas a cadeia peptídica de um único tipo de sideróforo (CORNELIS; HOHNADEL; MEYER, 1989; DE CHIAL et al., 2003; HOHNADEL; MEYER, 1988; SPENCER et al., 2003), apesar de que, alguns isolados são capazes de reconhecer vários tipos de sideróforos devido ao fato de expressarem diferentes receptores (BARELMANN et al., 2002; GHYSELS et al., 2004).

Depois de produzidos, os sideróforos são excretados para o meio extracelular, onde irão se ligar ao íon ferro e poderão ser captados por algum organismo que apresente receptor compatível. Clones da mesma cepa compartilham sideróforos entre si, mas não com outras cepas (HARRISON; BUCKLING, 2009; VOSS et al., 2000; WEST; BUCKLING, 2003).

Em geral, sideróforos podem ser classificados em três categorias, dependendo das porções que doam oxigênio para o ferro: a) catecolatos (ou fenolatos); b) hidroxamatos (ou carboxilatos) e c) mistos. As enterobactinas (produzidas por *Streptomyces* sp.), vibriobactinas (produzidas por *Vibrio cholerae*) e pioquelinas (produzidas por *Pseudomonas aeruginosa*) são exemplos de sideróforos catecolatos. Como exemplos de sideróforos hidroxamatos, podemos citar as alcaliginas (produzidas por *Alcaligenes denitrificans*) e as estafiloferrinas (produzidas por *Staphylococcus spp.*). As micobactinas (produzidas por *Mycobacterium tuberculosis*) e petrobactinas (produzidas por *Bacillus anthraxis*) são exemplos de sideróforos mistos (MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

As figura 1 ilustra exemplos de sideróforos catecolatos, hidroxamatos e mistos.

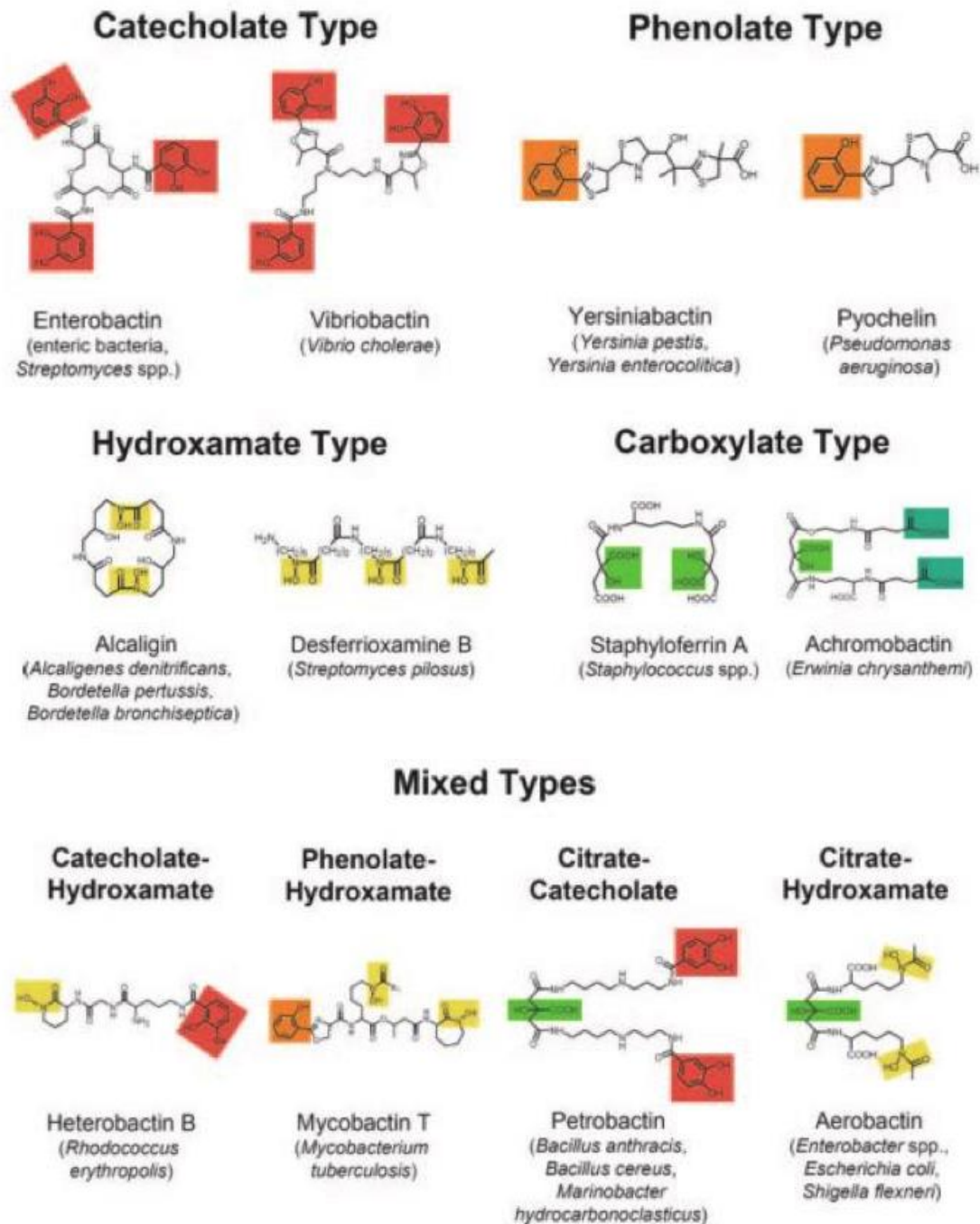


Figura 1. Estruturas dos diferentes tipos de sideróforos e seus organismos produtores. As partes envolvidas na coordenação da captação do ferro estão destacadas nas seguintes cores: catecolatos estão em vermelho, fenolatos estão em laranja, hidroxamatos estão em amarelo, α -hidroxi-carboxilatos estão em verde e α -ceto-carboxilases estão em azul. (MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

A deficiência de ferro é o fator chave para a regulação da síntese dos sideróforos; no entanto, outros fatores externos desempenham importante papel nessa

regulação. Como exemplos desses fatores podemos citar o pH, temperatura, fontes de carbono e outros metais (WINKELMANN, 2007).

Existem duas vias envolvidas na síntese de sideróforos: a via dependente de peptídeos sintases não-ribossomais (NRPS) (GEHRING; BRADLEY; WALSH, 1997; KEATING; MARSHALL; WALSH, 2000) e a independente de NRPS (CHALLIS, 2005; OVES-COSTALES; KADI; CHALLIS, 2009). Podemos citar vários sideróforos que apresentam síntese dependente de NRPS como as pioquelinas (KEATING; MARSHALL; WALSH, 2000) e pioverdinas (LAMONT et al., 2006; STINTZI et al., 1996) produzidas por *P. aeruginosa*, enterobactina, produzida por *E.coli* (GEHRING; BRADLEY; WALSH, 1997) e micobactinas produzidas por *M. tuberculosis* (QUADRI et al., 1998).

Ao contrário do que ocorre na síntese da maioria dos peptídeos, que são produzidos a partir de um RNA mensageiro, peptídeos sintetizados pelas NRPS não necessitam deste molde de RNA para serem produzidos. As NRPS produzem os peptídeos a partir de um amplo complexo multi-enzimático e são responsáveis pela síntese de diversos peptídeos muito importantes biologicamente. (CROSA; WALSH, 2002; GRÜNEWALD; MARAHIEL, 2006). As NRPS, em geral, são formadas por três domínios, que são: domínio de adenilação; domínio de tiolação e domínio de condensação. Estes domínios, juntos, são responsáveis pela montagem de um grande arranjo de amino, hidroxí e carboxiácidos em diferentes combinações a fim de produzirem peptídeos com alta variabilidade estrutural (FINKING; MARAHIEL, 2004).

O domínio de adenilação tem o papel de reconhecer e ativar o aminoácido que, posteriormente, se ligará ao domínio de tiolação. Este aminoácido, em seguida, será incorporado à cadeia polipeptídica em crescimento para, finalmente, passar a fazer parte da cadeia peptídica através do domínio de condensação. Após este processo, a cadeia polipeptídica formada é secretada pela sintase por um evento de ciclização e catalisação pelo terminal C do domínio de tiolação (KOHLI et al., 2001).

A figura 2 faz uma analogia entre os domínios existentes em uma maquinaria NRPS e as enzimas envolvidas na maquinaria de síntese de peptídeos via ribossomal.

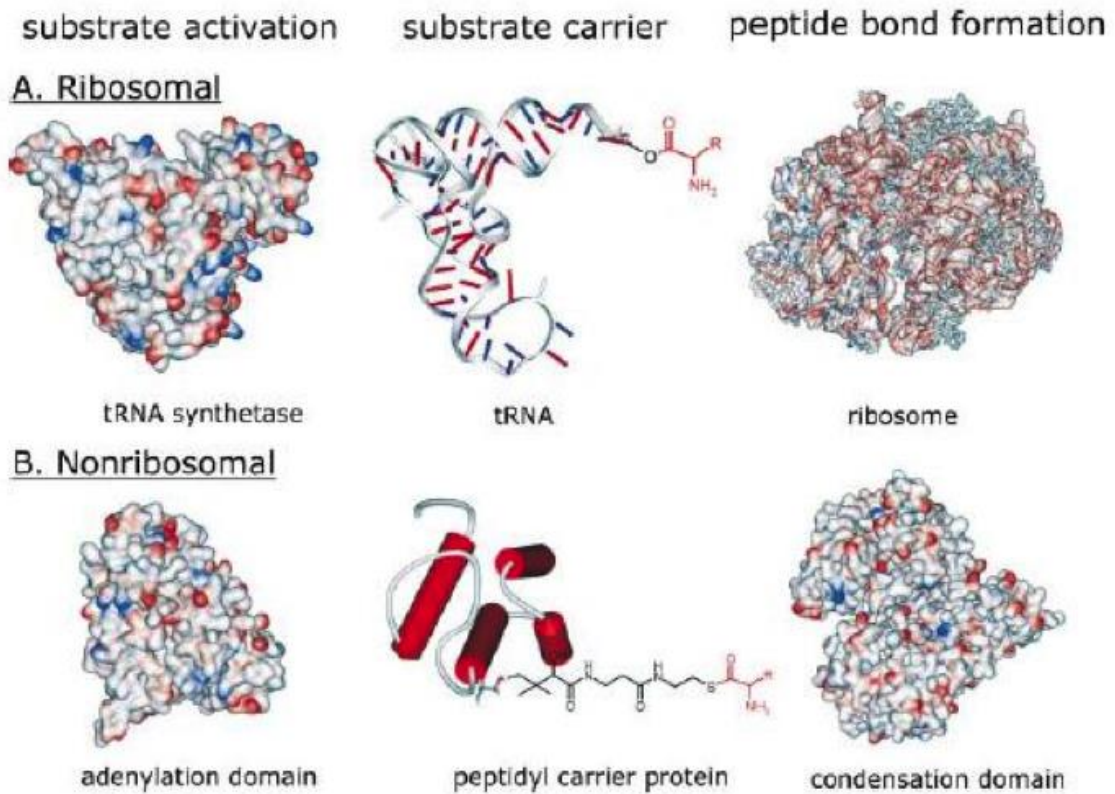


Figura 2. (A) Enzimas da maquinaria ribossomal para a produção de peptídeos e proteínas. (B) Enzimas básicas do sistema não- ribossomal (FINKING; MARAHIEL, 2004).

NRPS consiste em um arranjo de módulos. Um módulo é definido como uma seção da cadeia polipeptídica do NRPS que é responsável pela incorporação de um “bloco” no crescimento da cadeia polipeptídica. Os aminoácidos que serão incorporados no peptídeo são determinados pelos módulos, assim, NRPS funciona como molde e também como maquinaria de biossíntese desses peptídeos, pois proporciona todas as funções catalíticas necessárias na construção desses peptídeos (FINKING; MARAHIEL, 2004). A figura 3 ilustra a organização desses módulos e domínios em um NRPS.

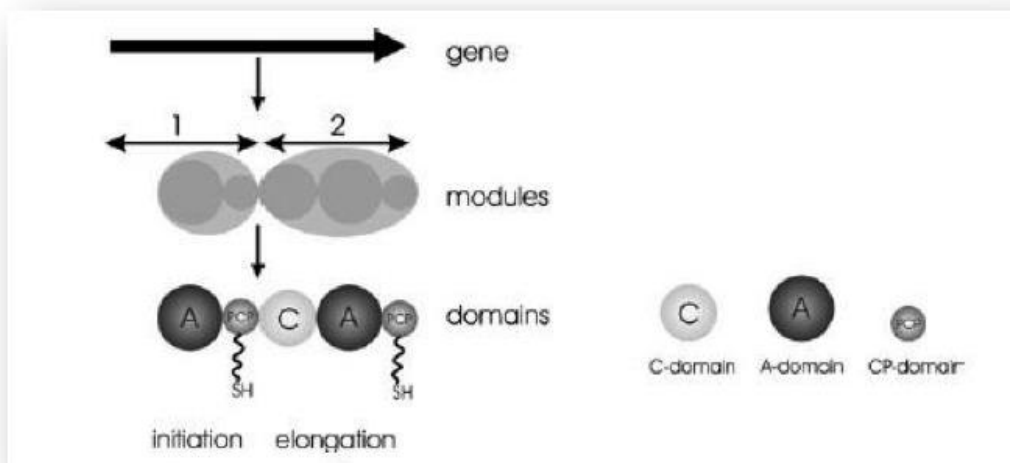


Figura 3. Representação estrutural, a partir do gene, da estrutura de módulos e domínios observada em um NRPS (FINKING; MARAHIEL, 2004). Domínio C: de condensação, domínio A: de adenilação e domínio PCP: proteína carreadora de peptídeo.

Existem outros complexos de sintases formados por vários módulos. Um deles são os policetídeos sintases (PKS), formados por três domínios: o domínio acil-transferase (AT), que reconhece e “carrega” pequenos ácidos carboxílicos, um domínio de proteína acil-carreadora (PAC) que se assemelha ao domínio T de NRPS e um domínio ceto-sintase, que constrói a cadeia de policetídeos via condensação (KHAYATT et al., 2013).

NRPS e PKS possuem características estruturais que os permitem formar um híbrido NRPS-PKS. Este híbrido, por sua vez, possui um quarto domínio, o domínio tio-esterase (TE), que secreta as cadeias de polipeptídeos e policetídeos montadas pelas sintases (KHAYATT et al., 2013).

As micobactérias, como a grande maioria das bactérias, também produzem sideróforos para sequestrar o íon ferro. As micobactinas são sideróforos que derivam do ácido salicílico e que possuem uma “capa” de hidroxiaril-oxazolina e duas N-hidroxiamidas que, juntas, formam um sítio de alta afinidade pelo íon férrico (SNOW, 1970). Duas formas de micobactina são produzidas e estas diferem entre si no comprimento de uma substituição alquil, o que acaba interferindo na solubilidade e polaridade das duas moléculas. A carboximicobactina constitui a forma mais polar e é secretada para o meio extracelular enquanto que a micobactina, que é a forma menos

polar, permanece associada à célula (RATLEDGE, 1999). O sideróforo carboximicobactina possui a propriedade de sequestrar o ferro de proteínas do hospedeiro que também possuem a propriedade de se ligarem à este íon (GOBIN; HORWITZ, 1996). A figura 4 ilustra a estrutura química dos sideróforos micobactina e carboximicobactina:

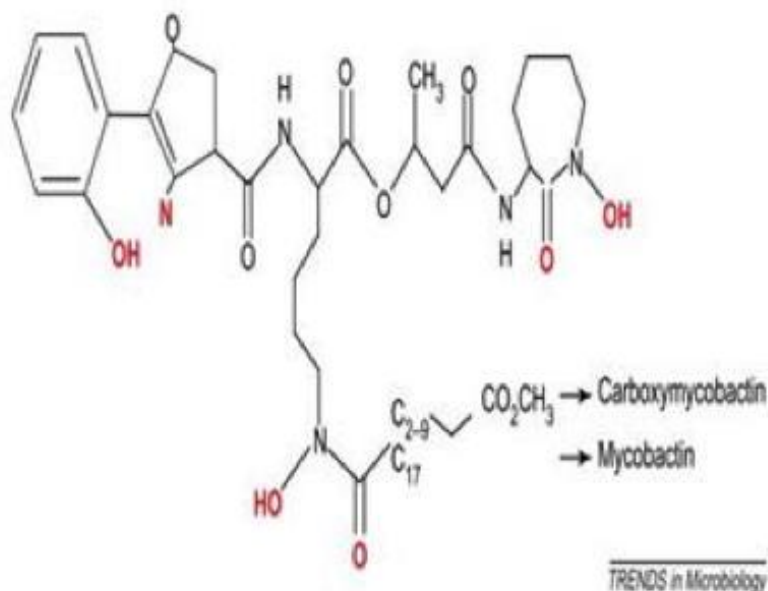


Figura 4. Sideróforo de *M. tuberculosis*. Carboximicobactina e micobactina compartilham uma estrutura comum mas diferem no tamanho da substituição alquila, a qual determina sua polaridade e solubilidade (RATLEDGE, 1999).

A partir de análises da sequência gênica de *M. tuberculosis*, foi encontrado um cluster de 10 genes (designados *mbta-j*), responsável por codificar enzimas essencialmente necessárias para a síntese da micobactina (CAMUS et al., 2002; COLE et al., 1998; QUADRI et al., 1998). Dos genes *mbt* já descritos, cinco formam uma linha de montagem dos NRPS (*mbtb*, *mbte* e *mbtf*) e dos PKS (*mbtc* e *mbtd*) que, juntos, ativam e alongam os monômeros da micobactina. O gene *mbti* codifica uma isocorismato sintase e esta, juntamente com a *mbtA*, uma enzima de adenilação, fornecem o salicilato ativado. Considera-se que a iniciação da cadeia da micobactina ocorre a partir da acilação de um domínio arila da proteína *mbtB* com este salicilato ativado (QUADRI, 2000; QUADRI et al., 1998). Em experimentos de substituição genômica, o gene *mbtb* foi deletado e um marcador de antibiótico foi inserido, produzindo uma cepa mutante de *M. tuberculosis* que não foi capaz de produzir a micobactina. Experimentos para avaliar o crescimento desta cepa mutante em meio com

baixa concentração de ferro mostraram que o crescimento desta cepa se apresentava limitado nestas condições (VOSS et al., 2000).

Ainda não se sabe, ao certo, o mecanismo exato de montagem das proteínas mbts. Um recente estudo sugere que, primeiramente, todos os precursores responsáveis pela síntese das micobactinas devem ser sintetizados e só depois ocorre a montagem do complexo MBT, com a proteína mbtH interagindo com vários domínios. A figura 5 ilustra este provável sistema de montagem:

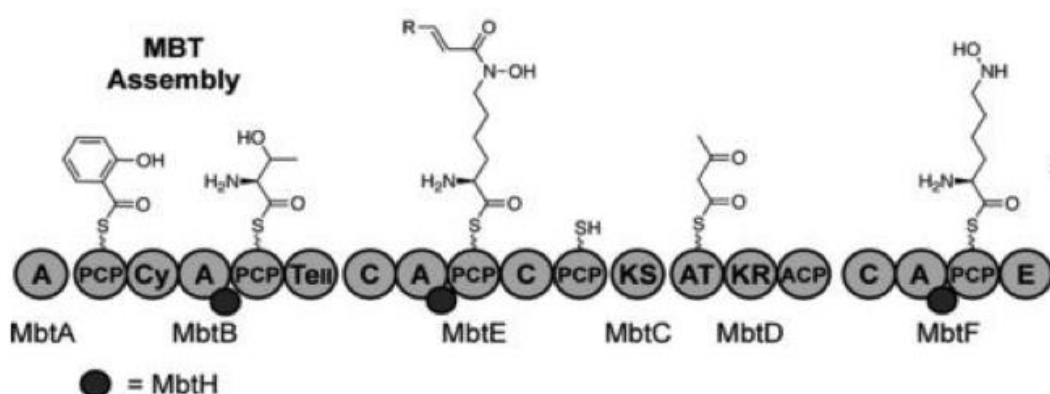


Figura 5. Provável sistema de montagem das micobactinas (complexo MBT): mbtB, mbtE e mbtF interagindo com mbtH. A, domínio de adenilação; PCP, domínio da proteína carreadora peptídica; C, domínio de condensação; Cy, domínio de ciclização; TeII, tioesterase tipo II; KS, ketosintase; AT, aciltransferase; KR, ketoreductase; E, epimerase (MCMAHON et al., 2012).

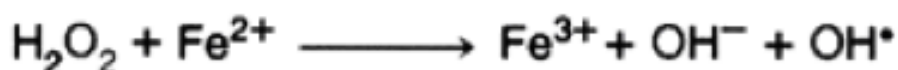
Esse complexo MBT, responsável em *M. tuberculosis* pela síntese das micobactinas, funciona sob a regulação da proteína reguladora dependente de ferro (IdeR), que controla a síntese dos sideróforos. A proteína IdeR é um sensor do íon ferro que atua com duas funções, como promotor e repressor, se ligando nos sítios responsáveis por essas ativações de acordo com a disponibilidade do íon ferro (RODRIGUEZ et al., 2002).

Por exemplo, IdeR se liga ao DNA quando os níveis de ferro estão elevados, inibindo a transcrição dos genes *mbta-j*, usados para a síntese dos sideróforos, e ativa a transcrição dos genes *brfa*, que controlam o armazenamento de ferro. Quando os níveis de ferro estão baixos, como durante uma infecção, IdeR se dissocia do DNA, tornando possível a transcrição dos genes necessários à síntese das micobactinas e reprime a transcrição de genes que codificam proteínas responsáveis pelo armazenamento de ferro (RODRIGUEZ et al., 2002).

A captação de ferro a partir da micobactina extracelular, a carboximicobactina, parece ser facilitada por difusão enquanto que a micobactina associada à célula pode ter como papel o armazenamento de ferro antes da transferência deste íon para o citoplasma (MATZANKE et al., 1997; RATLEDGE; DOVER, 2000).

Sabemos que, apesar do ferro ser essencial, excesso de ferro livre causa efeitos potencialmente tóxicos para a célula, já que este íon cataliza a produção de radicais reativos de O₂ pela reação de Fenton (ANDREWS, 1998). Consequentemente, todos os organismos vivos regulam severamente os níveis celulares de ferro, empregando eficientes mecanismos de aquisição e estoque deste íon.

Seqüência da reação de Fenton



<http://hipertensaosaude.blogspot.com.br/2013/06/antioxidantes-e-reacao-de-fenton.html>

Os microrganismos em geral possuem dois tipos de proteínas para estocagem de ferro: ferritinas (Ftn) e bacterioferritinas (Bfr) (ANDREWS, 1998). As duas se distinguem pela presença do grupo heme nas bacterioferritinas. A função primária das bacterioferritinas e ferritinas é estocar ferro durante a adequação deste íon e suprir a célula, quando necessários, para várias funções (REDDY et al., 2012).

O sequenciamento de *M. tuberculosis* H37Rv revelou a presença de duas putativas proteínas de estocagem de ferro, nomeadas BfrA (Rv1876), uma bacterioferritina, e BfrB (Rv3841), uma proteína similar à ferritina. A expressão de ambas proteínas é regulada pelo regulador IdeR (RODRIGUEZ et al., 2002).

IdeR desempenha um papel no metabolismo micobacteriano que é bem documentado e regula cerca de um terço dos genes envolvidos no metabolismo do íon ferro (RODRIGUEZ et al., 2002). IdeR regula negativamente a biosíntese de sideróforos e modula positivamente a estocagem de ferro em condições de excesso de ferro. Este regulador está envolvido também na resposta ao stress oxidativo, tanto em

M. tuberculosis quanto em *M. smegmatis* (DUSSURGET; RODRIGUEZ; SMITH, 1996; RODRIGUEZ et al., 2002). A presença do íon ferro irá permitir que o complexo metal-IdeR se ligue às regiões regulatórias de *mbta*, *mbtb* e *mbti* bloqueando a transcrição destes genes (DUSSURGET et al., 1999; GOLD et al., 2001).

Já foi descrito que os íons Fe^{3+} são transferidos para a membrana celular pelas micobactinas (ligadas à este íon) e este ferro é então convertido à Fe^{2+} pela ação das redutases. Após este processo, o íon ferroso é secretado para o citoplasma. Com o auxílio do salicilato citoplasmático, o ferro é então transferido para apoproteínas ou para porfirinas, onde irá atuar em suas diversas funções, ou então será transferido para as bacterioferritinas, que irão estocá-lo, ou a fim de manter a homeostase celular, ou para estocar este íon para uma necessidade futura. Todavia, mais de 90% do ferro permanece estocado. Resumidamente, as micobactinas podem armazenar o íon ferro por algum período, no entanto o estoque final é sempre as bacterioferritinas (ADILAKSHMI; AYLING; RATLEDGE, 2000; MATZANKE et al., 1997). A figura 6 representa um esquema de como aconteceria esse processo.

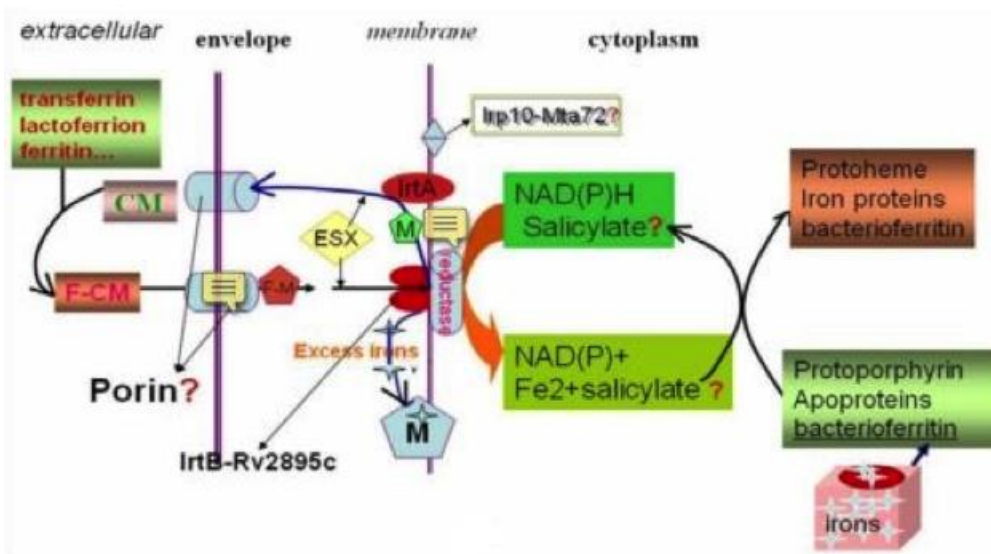


Figura 6 Esquema de transporte de ferro feito pelas carboximicobactinas. Na figura, CM: carboximicobactina; F: ferro; F-CM: ferri-carboximicobactina; M: micobactina; ?: componentes putativos envolvidos no transporte (RATLEDGE, 2004).

Podemos observar que as carboximicobactinas extracelulares, livres de Fe, roubam este íon das proteínas de ligação ao ferro do hospedeiro e se tornam ferri-carboximicobactinas. O ferro é então transferido às micobactinas, também livres de Fe, que estão associadas à parede celular da bactéria e se tornam ferri-micobactinas. Os íons

ferro são, então, transferridos para a membrana celular pelas ferri-micobactinas. Nesta etapa, o Fe^{3+} é convertido a Fe^{2+} pelas redutases e secretado para o citoplasma. Por fim, o excesso de Fe pode ser estocado ou envolvido em processos fisiológicos.

2 JUSTIFICATIVA

Sabemos que as MCRs são responsáveis por diversas infecções podendo até mesmo levar o indivíduo acometido a óbito. Compreender os mecanismos que essas bactérias utilizam para viabilizar sua instalação no hospedeiro e desenvolver as patologias características de cada espécie é algo de extrema importância, não só para o tratamento, como também para o estudo acerca de metodologias de prevenção e controle destas infecções.

Uma das MCRs que têm sido motivo de preocupação é a *Mycobacterium massiliense*. Esta bactéria trata-se de uma MCR que foi recentemente identificada e agrupada, juntamente com *M. bolletti*, no complexo *Mycobacterium abscessus* (ADÉKAMBI; DRANCOURT, 2004; ADÉKAMBI et al., 2006). *M. massiliense* era anteriormente erroneamente identificada como *M. abscessus*, mas esta diferenciação pode ser feita através do sequenciamento de alguns genes, como o *rpoB* (ADÉKAMBI et al., 2006; CHADHA et al., 1998; CONVILLE; WITEBSKY, 1998).

A preocupação acerca das infecções causadas por *M. massiliense* se deve aos vários relatos de surtos causados por esta bactéria como também pelos equívocos constantes que ocorrem ao identificar esta bactéria como *M. abscessus*, o que prejudica o tratamento. Além disso, ampliar os conhecimentos acerca de *M. massiliense* é algo relevante no sentido de desenvolver estratégias para o seu correto diagnóstico.

Diversos fatores estão envolvidos no sucesso da infecção e instalação de uma bactéria no hospedeiro. Um desses fatores é a aquisição de ferro pelas bactérias, já que o ferro atua na manutenção do funcionamento de vias metabólicas essenciais presentes nos organismos vivos em geral. A fim de competir com o hospedeiro pelo ferro, bactérias produzem moléculas conhecidas como sideróforos, que atuam na captação do ferro disponível neste hospedeiro. Sem os sideróforos, as bactérias seriam incapazes de estabelecer essa competição e captar a quantidade de ferro que necessita para sua sobrevivência.

Experimentos *in vivo*, realizados em camundongos, já demonstraram que *M. tuberculosis* depende fortemente do íon ferro, uma vez que este bacilo se multiplica rapidamente *in vivo* quando em condições onde há excesso de ferro. Já na depleção do íon ferro o crescimento e desenvolvimento da bactéria *in vivo* é prejudicado e se torna defeituoso (SCHAIBLE; KAUFMANN, 2004). Com isto, é possível afirmar que a aquisição de ferro por *M. tuberculosis* é um dos primeiros eventos que devem ocorrer para garantir o sucesso da infecção (RATLEDGE, 2004).

Entre os genes envolvidos na biossíntese das proteínas responsáveis pela montagem dos sideróforos em *M. tuberculosis* (*mbta-j*), o gene *mbtb* foi escolhido como alvo deste estudo por se tratar do gene com maiores informações descritas até o momento, sobre sua atuação e importância no esquema de montagem das micobactinas.

Já foi demonstrado que cepas de *M. tuberculosis* que tiveram o gene *mbtb* deletado foram incapazes de produzir micobactina ou carboximicobactina. Como resultado, as cepas de *M. tuberculosis* com esta mutação apresentam dificuldade na habilidade de replicar em meios com baixa concentração de ferro além de terem sua capacidade de infectar macrófagos prejudicada (RODRIGUEZ, 2006).

Além da deleção do gene *mbtb* em *M. tuberculosis*, este gene também já foi deletado em cepas de BCG (*BCGΔmbtb*) e estas também demonstraram-se incapazes de replicar em meio com baixa concentração de ferro. No entanto, culturas de *BCGΔmbtb* suplementadas com micobactina exógena mostraram-se capazes de replicar e crescer em meio 7H9 (TULLIUS et al., 2011).

O gene *mbtb* também já foi estudado em experimentos *in vivo* realizados em camundongos infectados com *M. tuberculosis* onde foi demonstrado que os níveis de RNA mensageiro de *mbtb* aumentam semanas após a infecção dos camundongos com *M. tuberculosis* (BOELAERT et al., 2007).

Diante de tantas confirmações de que o gene *mbtb* é essencial para a montagem das micobactinas em *M. tuberculosis* e que, na ausência desta montagem, *M. tuberculosis* perde sua capacidade de replicação, entendemos que o gene *mbtb* seria um importante gene de escolha para dar início ao estudo da provável síntese de micobactina em *M. massiliense*.

A partir de análises do genoma completo de *M. Massiliense* realizado pelo nosso grupo em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília, encontramos seqüências gênicas que possuem mais de 50% de similaridade com a seqüência já descrita do gene *mbtb* de *M. tuberculosis* (Rv2383c). Posteriormente, verificamos a proteína hipotética que poderia ser transcrita a partir desta seqüência e encontramos uma similaridade também superior à 50% entre os aminoácidos da seqüência hipotética de *M. massiliense* com a seqüência de aminoácidos da proteína do gene *mbtb*. Isso indica que *M. massiliense* contém um gene semelhante ao *mbtb* que pode apresentar funções também semelhantes, codificando uma proteína que pode estar atuando como um sideróforo.

Determinar se *M. massiliense* possui um gene similar ao *mbtb* de *M. tuberculosis*, assim como analisar se ocorre a expressão deste gene *in vitro* e *in vivo* em condições de privação de ferro será de grande valia para avançar no conhecimento de possíveis mecanismos de patogenicidade deste microrganismo. Além disso, novas formas de tratamento de infecções causadas por *M. massiliense*, como inibidores da síntese de *mbtb*, podem ser alcançadas a partir deste estudo.

Diante disso, propomos, através de técnicas moleculares que permitem avaliar a expressão e a quantificação de um gene, como a PCR em tempo real, construir oligonucleotídeos iniciadores que permitam a amplificação do suposto gene similar ao *mbtb* (*smbtb*) em questão e avaliar se o mesmo é expresso em *M. massiliense* detectando RNA mensageiro (RNAm). Além disso, propomos também quantificar sua expressão tanto *in vivo* quanto *in vitro*, na presença e na ausência de ferro.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a expressão de um gene putativo responsável pela síntese de sideróforo em *M. massiliense*.

3.2 Objetivos específicos:

- Sequenciar o gene homólogo ao *mbtb* de *M. massiliense*.
- Detectar RNAm do gene homólogo de *mbtb* em *M. massiliense* crescido *in vitro*;
- Padronizar método para quantificar a expressão do gene homólogo de *mbtb* através de PCR em tempo real em *M. massiliense*;
- Quantificar a expressão do gene homólogo ao *mbtb* em culturas com e sem ferro.
- Quantificar a expressão do gene homólogo ao *mbtb* durante a infecção experimental em camundongos;

4 MÉTODOS

4.1 Isolados de *Mycobacterium massiliense*

Isolados clínicos de infecções pós-cirúrgicas foram recebidos pelo LACEN-GO, durante o surto ocorrido entre maio e dezembro de 2006 e, destes, 18 isolados foram caracterizados como *M. massiliense* a partir do sequenciamento parcial dos genes *rpob* e *hsp65* (CARDOSO et al., 2008).

A cepa GO06 foi escolhida para ser usada nos diferentes ensaios e análises. A mesma foi mantida com glicerol a 20% em freezer -80°C e reativada para a realização dos experimentos *in vivo* e *in vitro* deste trabalho.

4.2 Reativação da cepa GO06

A cepa GO06, que foi retirada do freezer -80°C, foi cultivada em meio *Mueller Hinton* caldo para a reativação da mesma. Para isto, fez-se um inóculo desta cepa em 5 mL de caldo *Mueller Hinton* (pré-inóculo) e, a partir deste pré-inóculo, cultivou-se a cepa em shaker a 37°C por um período de três dias.

Devido ao fato de que a bactéria encontrava-se armazenada a -80°C e, portanto, apresentava seu metabolismo em estado de injúria, o pré-inóculo foi realizado a fim de garantir um enriquecimento e homogeneidade no metabolismo das bactérias que constituirão o inóculo que será utilizado no experimento.

O meio de cultura *Mueller Hinton* é aprovado pelo manual do “Clinical and Laboratory Standards Institute” e oferece condições para o crescimento das principais bactérias. Foi escolhido para ser utilizado como o meio padrão para o crescimento de *M. massiliense* neste estudo devido ao fato de que propicia o crescimento desta micobactéria em tempo e condições semelhantes àsquelas obtidas com meios específicos para micobactérias e tem custo bem menor quando comparado a estes últimos (meio 7H11, por exemplo).

Após o crescimento bacteriano, a cepa foi centrifugada e o sedimento resultante foi ressuspenso em solução estéril de glicerol 20% a fim de armazenar a cepa em freezer -20°C para posteriores utilizações.

4.3 Sequenciamento da cepa de *Mycobacterium massiliense* GO06

4.3.1 Cultivo de *M. massiliense* em meio *Mueller Hinton*

O isolado de *M. massiliense* reativado (item 4.2) foi inoculado em tubos de rosca contendo meio caldo *Mueller Hinton* e, em seguida, a cultura foi colocada em incubadora com agitação, à 37°C. Após um intervalo de três dias, as culturas foram retiradas da incubadora para posterior extração de DNA.

4.3.2 Extração de DNA de *M. massiliense*

A extração de DNA seguiu a descrita por van Soolingen et al (1994) com algumas adaptações (VAN SOOLINGEN et al., 1994). Em capela com fluxo laminar, adicionou-se 1 mL da cultura de *M. massiliense* a um tubo de 1,5 mL devidamente identificado. O tubo foi centrifugado à 5000g por 5 minutos e, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento bacteriano resultante no tubo, adicionou-se mais 1 mL da cultura e realizou-se o mesmo procedimento por mais duas vezes.

Após o último descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado com 400 µL de tampão TE seguido da adição de 12 µL de lisozima (20mg/mL) ao tubo. Após esta adição, os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex para que o sedimento bacteriano fosse ressuspensionado e se misturasse às soluções adicionadas. O sistema foi incubado em banho maria à 37°C, por 90 minutos. Após este intervalo, o tubo foi retirado do banho e acrescentou-se 70 µL de SDS (10%) e 12 µL de proteinase K (20 mg/mL). O sistema foi novamente incubado, agora à 56°C, por 15 minutos.

Posteriormente à esta segunda incubação, adicionou-se 100 µL de NaCl 5,0M e 80 µL de solução CTAB/NaCl (10% CTAB, 0,73 M NaCl). A solução foi lentamente agitada, até que a mesma atingisse um aspecto leitoso. O sistema foi novamente incubado, desta vez por 10 minutos, à 65°C.

Após esta terceira incubação, acrescentou-se 650 µL de clorofil (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1, v/v) ao sistema e o mesmo foi agitado por 30 segundos. O tubo foi então centrifugado a 12000 g por 5 minutos.

Após esta centrifugação, transferiu-se o sobrenadante para outro tubo, limpo e estéril, devidamente identificado. Adicionou-se 400 µL de isopropanol gelado e homogeneizou-se a solução. O sistema foi incubado à -20°C por 24 horas.

Após este período de incubação, o tubo foi centrifugado a 12000 g por 20 minutos, à 4°C. Lavou-se o sedimento resultante com álcool gelado a 70% e o tubo foi colocado em repouso, em posição invertida, para evaporação do álcool. O DNA foi então ressuspensionado em 50 µL de água miliQ.

4.3.3 Amplificação da ORF 9522 de *M. massiliense*

O DNA do isolado de *M. massiliense* GO06 foi amplificado utilizando-se o seguinte par de oligonucleotídeos: 5' GATAGTCATATGGAAGCAATCAAGTAGGGACG 3' denominado *mbtb*-Fwd e 5' TCCGAAGCTTGACGGTCCCGGCCAAG 3', chamado *mbtb*-Rev.

O protocolo utilizado no termociclador foi o seguinte:

| Ciclo Número | Repetições | Temperatura | Tempo |
|--------------|------------|-------------------------|--|
| 1 | 0 | 94° C | 3 minutos |
| 2 | 30 | 94° C 55° C 72° C | 45 segundos 45 segundos 1 minuto |
| 3 | 0 | 72° C | 10 minutos |
| 4 | | 4° C | Infinito |

O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,5µL/mL) seguido de visualização do produto amplificado e confirmação do tamanho esperado do fragmento em fotodocumentador *GelDoc* (BioRad).

4.3.4 Purificação do produto de PCR

O produto da PCR descrita no item 4.3.3 foi purificado utilizando-se o kit *Illustra ExoProStar 1-Step* (GE) seguindo as orientações indicadas pelo fabricante.

4.3.5 Amplificação do produto de PCR para posterior sequenciamento

O produto de PCR purificado foi submetido à reação de amplificação para o sequenciamento. Para esta reação, utilizou-se cada um dos oligonucleotídeos

iniciadores, listados na tabela 1, isoladamente. A amplificação foi realizada utilizando-se o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, da *Life Technologies*, seguindo as instruções indicadas pelo fabricante. O protocolo utilizado no termociclador para a amplificação foi o seguinte:

| Ciclo Número | Repetições | Temperatura | Tempo |
|--------------|------------|-------------|-------------|
| 1 | 0 | 94° C | 3 minutos |
| 2 | 30 | 95° C | 20 segundos |
| | | 50° C | 15 segundos |
| | | 60° C | 1 minuto |
| 3 | | 4° C | Infinito |

Após a amplificação, os produtos foram precipitados com isopropanol e submetidos ao sequenciamento, realizado pelo equipamento ABI3130, da *Applied Biosystems*.

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento da ORF 9522 de *M. massiliense* (A posição de anelamento indicada na tabela se refere à posição do primer na orf 9522 e não no genoma completo).

| Nome do Oligonucleotídeo | Sequência 5' – 3' | Posição de anelamento |
|--------------------------|------------------------|-----------------------|
| <i>Mtb</i> -Fwd | GAAGCAATCAGTAGGG | 4pb |
| Myco-Fwd | GACGCGATGAGCTACCGSATC | 703pb |
| <i>mtb4</i> -Fwd | TCGGCGCAGAGCCGATTCTT | 1054pb |
| <i>mtb4</i> -Rev | GGGGAGGCTTGCTGTTGAACT | 1439pb |
| <i>mtb5</i> -Fwd | GTGCTACTGGACGCTCAGGT | 1408pb |
| <i>mtb6</i> -Fwd | GACGAGGACGGTGTGTGGTCC | 1720pb |
| <i>mtb6</i> -Rev | GATGCTTCGCAGATCGCATAAC | 2056pb |
| <i>mtb8</i> -Fwd | GGGAGGTGACTGGGTAAGTTC | 2430pb |
| <i>mtb8</i> -Rev | CGCGCCGACCATCAGGTG | 2818pb |
| <i>mtb9</i> -Fwd | GCTACTGGCCCGATGGGAC | 2783pb |

Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram analisadas e alinhadas à ORF 9522 descrita no banco de dados de *M. massiliense* (<http://www.biomol.unb.br/massiliense/database.php?id=2027&table=0>) através do software *Bioedit*.

4.4 Ensaio com meio *Overlay Chrome azurol S (O-CAS)* para visualização da produção de sideróforos

O mais comum e mais utilizado método para a detecção da produção de sideróforos é o ensaio universal de Schwyn e Neilands (1987). Este ensaio é baseado na competição pelo ferro entre o complexo férrico do *dye chromeazurol S (CAS)* e o sideróforo. O ensaio CAS pode ser aplicado como um teste líquido ou, alternativamente, o *dye* pode ser incorporado em meio sólido, para a detecção de sideróforo neste tipo de meio (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

O ensaio CAS para sobrenadantes de culturas líquidas pode ser considerado um ensaio quantitativo, no entanto, em meio sólido não é possível quantificar a reação CAS (SCHWYN; NEILANDS, 1987).

A variação do ensaio CAS, utilizando este meio como *overlay*, foi desenvolvido por Pérez-Miranda (2007) a fim de diminuir algumas falhas neste teste, como o fato de que, quando incorporado diretamente no meio onde o microrganismo cresceria, alguns componentes do CAS poderiam inibir o crescimento de algumas classes de microrganismos (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007).

Para este experimento, foram utilizadas placas contendo meio mínimo, feito segundo o item 4.4 e, acrescido de 1,5% de agarose. A utilização de agarose como agente gelificante ao invés de ágar bacteriológico (que é mais comumente utilizado na confecção de meios sólidos) deu-se a fim de evitar a contaminação do meio com ferro.

A fonte de ferro utilizada para suplementar as placas foi citrato férrico amoniacal ($C_6H_8O_7 \cdot xFe \cdot xNH$) por ser mais solúvel que o citrato férrico e, portanto, mais fácil de se dissolver no meio mínimo com agarose.

As concentrações de Fe estabelecidas para este experimento foram: 0 μ M, 24 μ M, 48 μ M, 72 μ M e 96 μ M.

A cepa GO06 foi preparada, para este experimento, da mesma forma que no experimento 4.5. No entanto, ao invés de ser inoculada em meio líquido, as células ressuspendidas em meio mínimo após centrifugação foram ajustadas para o índice 0.5 da escala de *MacFarland* e 100 μ L desta suspensão foram plaqueados em cada placa.

Após plaqueamento, as placas foram colocadas em estufa à 37° e ficaram incubadas por 5 dias. Após este período, as placas foram retiradas da estufa (foi possível visualizar o crescimento das bactérias a olho nu), abertas em fluxo laminar onde cada uma delas recebeu 15 mL de meio O-CAS, que foi colocado sobre a cultura. O meio O-CAS foi produzido segundo Pérez-Miranda et al (2007).

Após a gelificação do meio O-CAS, as placas foram novamente levadas à estufa à 37° e, após um intervalo de aproximadamente 5 horas, observou-se a mudança da coloração do O-CAS nas placas.

4.5 Anotações genômicas

Além do suposto gene similar ao *mbtb*, outros genes envolvidos na captação de ferro e já descritos em outras micobactérias foram anotados *in silico* quanto à similaridade no genoma da cepa de *M. massiliense* GO06 (RAIOL et al., 2012). Os genes avaliados foram: *mbta*, *mbtc*, *mbtd*, *mbte*, *mbtf* e *mbtg*. A sequência nucleotídica de cada um destes genes foi retirada do banco de dados “Massiliense Database”, construído a partir do genoma da cepa de *M. massiliense* GO06 (<http://www.biomol.unb.br/massiliense/index.html>), descrita em 2012 por Raiol et al.

As sequências de nucleotídeos dos genes avaliados foram extraídas do banco de dados do Diretório do FTP do NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/>). A partir das sequências nucleotídicas, determinou-se as sequências de aminoácidos de cada proteína usando-se o “*Translate Tool*”, ferramenta do programa “*Expasy*” (<http://web.expasy.org/translate/>).

As sequências das seguintes micobactérias tiveram os genes citados acima avaliados: *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. abscessus*, *M. bovis BCG pasteur*.

As sequências gênicas foram anotadas utilizando-se o software “*Note Pad++*” e alinhadas no software “*Bio Edit*”.

4.6 Crescimento de *Mycobacterium massiliense* em meio mínimo

O meio utilizado para avaliar o crescimento do bacilo em diferentes concentrações de ferro foi o meio mínimo de Davis (sem dextrose) suplementado com 25 mM de Na₂HPO₄.7H₂O, 22 mM de KH₂PO₄, 8 mM de NaCl, 2 mM de MgSO₄, 0,1mM de CaCl₂, 7 mM de NH₄Cl, 4mM de piruvato de sódio e 10mM de dextrose. Os sais que

foram adicionados ao meio mínimo de Davis são os sais constituintes do meio M9, outro meio considerado mínimo e também muito utilizado em trabalhos que necessitam da utilização deste tipo de meio de cultura (KIEVIT; LAUTEN; MAURER, 2001).

4.7 Leitura das Densidades Óticas

A cepa GO06, que se encontrava estocada a -20°C , foi descongelada e inoculada em caldo *Mueller Hinton* para obtenção do inóculo que foi utilizado. Após 3 dias de crescimento, 3 mL do inóculo foram centrifugados e ressuspensos em meio mínimo no momento da realização do experimento.

Foram estabelecidas 5 diferentes concentrações de citrato férrico (0 μM , 24 μM , 48 μM , 72 μM e 96 μM). Quantidades iguais da suspensão de *M. massiliense* em meio mínimo foram inoculadas em tubos de fundo cônico, contendo 20 mL de meio mínimo cada. Além dos tubos onde *M. massiliense* foi inoculado, fez-se um controle onde a bactéria não foi inoculada por se tratar do controle de esterilidade, resultando em um total de 6 tubos.

As culturas foram armazenadas em incubadora com agitação a 37°C e no 5º dia iniciou-se a leitura das densidades óticas (DOs) das culturas, realizada de dois em dois dias, até o 19º dia do experimento.

A leitura das DOs foi realizada em espectrofotômetro, em um comprimento de onda de 590 nm.

Antes de cada leitura, todos os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex. Os tubos foram manuseados no interior de um fluxo laminar durante cada leitura.

Após cada leitura, os tubos foram fechados cuidadosamente, lacrados com parafilme e recolocados em incubadora com agitação a 37°C até o final do experimento.

4.8 Crescimento de *M. massiliense* em meio mínimo para coleta de células para posterior extração de RNA.

A cepa GO06, que se encontrava estocada a -20°C , foi descongelada e inoculada em caldo *Mueller Hinton* para obtenção do inóculo que foi utilizado. Após 3 dias de crescimento, 3 mL do inóculo foram centrifugados e ressuspensos em meio mínimo no momento da realização do experimento.

Para este experimento, foram estabelecidas 3 diferentes concentrações de citrato férrico: 0 μM , 72 μM e 144 μM . Os intervalos entre as concentrações utilizadas aqui foram maiores que aqueles utilizados no experimento para a leitura das DOs, com o objetivo de avaliar maiores diferenças na expressão de *smbtb*.

Quantidades iguais da suspensão de *M. massiliense* em meio mínimo foram inoculadas em tubos de fundo cônico, contendo 20 mL de meio mínimo cada. Este meio foi feito conforme descrito no item 4.6. Foram feitas triplicatas para cada concentração e, além dos tubos onde *M. massiliense* foi inoculado, fez-se um tubo controle onde a bactéria não foi inoculada por se tratar do controle de esterilidade, resultando em um total de 10 tubos.

As culturas foram armazenadas em incubadora com agitação a 37°C e no 5º dia iniciou-se a coleta de células.

4.8.1 Coleta das células para extração de RNA

Definiu-se os dias 5, 9 e 14 para a realização da coleta de células. Esta, foi realizada em tubos de 1,5 mL, submetendo-se as células à duas centrifugações a 10000 g por 2 minutos de 3,0 mL da cultura em cada concentração (1,5 mL por vez). Após o segundo descarte, todo o resquício de meio mínimo que se encontrava no tubo foi aspirado com pipeta para posterior armazenamento do sedimento celular em freezer -20°C.

Os sedimentos bacterianos foram armazenados, como citado acima, até o final do experimento e a extração de RNA se deu posteriormente, em um mesmo dia para todas as células coletadas.

4.9 Extração de RNA

Para a extração de RNA, utilizou-se o kit *Phenol-Free Total RNA Purification kit*, da *Amresco*. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do protocolo do fabricante.

Na etapa indicada no protocolo, as amostras foram tratadas com 1 Unidade de DNase I (Sigma) livre de RNase, a fim de eliminar a contaminação por DNA genômico.

Ao final do procedimento, os RNAs foram armazenados em freezer -20°C para posterior síntese de cDNA.

4.10 Síntese de cDNA

Para obtenção do cDNA, para cada 11 µL de RNA da amostra adicionou-se 1µL de oligonucleotídeos randômicos. Esta mistura foi incubada a 70°C por 5 minutos e em seguida a mesma foi incubada por 10 minutos no gelo. Posteriormente, uma mistura contendo a enzima transcriptase reversa (1 U), inibidor de RNase, dithiothreitol e desoxinucleotídeos (0,25 mM de cada) foi adicionada ao RNA.

As amostras foram então incubadas à 37°C por 90 minutos e, ao término deste intervalo, foram armazenadas à -20°C.

Como controle negativo, a mesma reação foi realizada sem adição da enzima transcriptase reversa. Este controle garantiu a ausência de DNA genômico contaminando as amostras de RNAs.

4.11 Avaliação da expressão do gene *smbtb* em camundongos infectados com *M. massiliense*, submetidos à suplementação ou à quelação do íon ferro

Foram utilizados três grupos com n=3 por grupo neste experimento. Camundongos C57/BL6 foram submetidos à diferentes tratamentos, de acordo com o grupo do qual faziam parte. A utilização dos camundongos neste projeto foi autorizada pelo comitê de ética de número 001/07 (anexo 2). Os grupos foram:

- Grupo Controle: tratados com salina tamponada em fosfato (PBS);
- Grupo DFO: tratados com o quelante *Deferoxamine Mesylate* (Sigma);
- Grupo Ferro: tratados com o suplemento Ferrodex (Solução de Ferro Dextrano, Tortuga).

Os camundongos começaram a serem tratados 20 dias antes da infecção.

Para o preparo das soluções que seriam utilizadas no tratamento dos camundongos, realizou-se antes a pesagem de todos os animais, afim de estimar a média de peso de cada grupo. Foi aplicado 1 mg/kg/dia do quelante DFO em cada camundongo do grupo DFO e 50 mg/kg/dia de ferro dextrano em cada camundongo do grupo Ferro (GAO et al., 2013). Cada tratamento foi realizado com intervalos de 48 horas e a concentração das soluções utilizadas foram estimadas para que fossem injetados 100 µL de cada

solução via intraperitoneal, utilizando-se seringa de 1 mL com agulha hipodérmica. Tanto a solução de DFO quanto a solução preparada com Ferrodex foram diluídas em PBS. O grupo controle recebeu injeção de 100 μ L de PBS em cada dia de tratamento.

Todas as soluções injetadas nos camundongos foram previamente esterilizadas por filtração em filtros para seringa de 0,22 μ m.

4.11.1 Geração de “bolsões de ar” (air pouch) nos camundongos

A infecção foi realizada em bolsões de ar (Figura 7) previamente gerados no dorso dos camundongos segundo Gaspar et al (2014). A escolha desta via de infecção para este estudo deu-se a fim de obter uma quantidade maior de RNA ao extrair este do lavado dos bolsões de ar em relação às pequenas quantidades de RNA que são obtidas quando se extrai este ácido nucleico de tecidos.

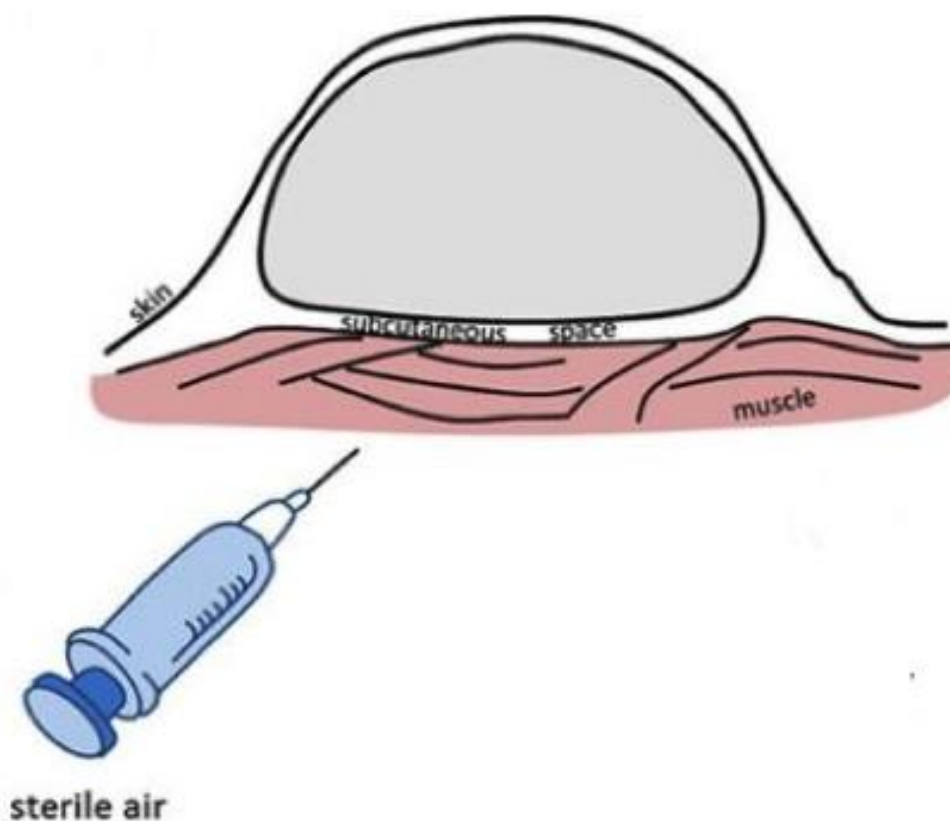


Figura 7. Esquema de formação dos bolsões de ar. Ar estéril foi injetado subcutaneamente no dorso de cada camundongo. Os bolsões descansaram por três dias afim de permitir a cicatrização da ferida gerada pela injeção de ar. Após este período, o bolsão foi então reinflado com 5 mL de ar estéril e os camundongos repousaram por mais 3 dias antes da infecção (adaptado de GASPARI; SAKAI; GASPARI, 2014).

A primeira injeção de ar esterilizado por filtração deu-se no dia 11 após o primeiro tratamento dos três grupos (dia 1 do experimento) para que o intervalo necessário para a formação dos bolsões de ar coincidisse com os 20 dias de tratamento aos quais os camundongos foram submetidos.

4.11.2 Infecção dos camundongos com *Mycobacterium massiliense*

Para a infecção dos camundongos, a cepa GO06 foi descongelada e um pré-inóculo com a mesma foi feito para a posterior realização do inóculo que seria utilizado para a infecção.

A partir do pré inóculo, 5 tubos de rosca contendo 5 mL de meio *Mueller Hinton* cada foram inoculados com *M. massiliense* e incubados em shaker a 37°C por 3 dias. No terceiro dia de crescimento as culturas dos 5 tubos foram dispensadas em um mesmo tubo de fundo cônico estéril de 50 mL e, após este procedimento, a cultura foi centrifugada por 10 minutos à 6000 g para obtenção do sedimento de bactérias.

O sedimento de bactérias foi ressuspenso em 10 mL de PBS estéril. Realizou-se então a leitura da densidade óptica desta suspensão (590 nm). A partir desta leitura ajustou-se a concentração bacteriana do inóculo para ser de aproximadamente 3×10^6 bactérias/mL. Um mL do inóculo foi injetado na bolha de ar de cada camundongo.

4.11.3 Eutanásia dos camundongos e lavado dos bolsões de ar

Três dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados e, posteriormente, realizou-se o lavado das bolsas de ar de cada um deles.

A realização do lavado deu-se injetando 3 mL de PBS estéril e, após a injeção, o lavado foi recuperado e armazenado em tubos de fundo cônico de 15 mL que repousavam em banho de gelo. Repetiu-se este procedimento lavando a bolha do camundongo por uma segunda vez.

Os tubos contendo o lavado de cada camundongo foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos para a obtenção do sedimento bacteriano. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento bacteriano foi armazenado a -20°C para posterior extração de RNA e síntese de cDNA.

4.12 Realização de PCR em tempo real

Tanto os cDNAs resultantes do experimento descrito no item 4.6 quanto os cDNAs resultantes do experimento descrito no item 4.11 foram submetidos à amplificação do gene alvo (*smbtb*) e do gene utilizado como normalizador das reações (rRNA 16S).

Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para a realização da PCR em tempo real. O par que tem como alvo o suposto gene similar ao *mbtb* de *M. tuberculosis* foi nomeado de Mass1 e apresentam as seguintes sequências: 5' AAGGCTGCGGTAGAGCGC 3' (Mass1-Fwd) e 5' GCCCGTCCTCTATGGCCAGGC 3' (Mass1-rev). Para a normalização dos resultados, escolheu-se o RNA ribossomal 16S e, o par de oligonucleotídeos desenhados para esse RNA como alvo apresentavam as seguintes sequências: 5' AGCTCGTAGGTGGTTTGTCG 3' (16S-Fwd) e 5' AATCCTGTTCGCTACCCACG 3' (16S-Rev).

A PCR em tempo real foi realizada utilizando-se a sonda *Sybr Green* (Biorad) para todas as amostras. O protocolo utilizado tanto para as reações realizadas para o gene alvo (*smbtb*) quanto para o gene normalizador (16S) foi o mesmo. Seguem as quantidades utilizadas de cada reagente:

| Componente | Volume |
|---------------------------------------|--------------|
| <i>Sybr Green</i> | 12 µL |
| Oligonucleotídeo <i>Fwd</i> (10mM) | 1,5 µL |
| Oligonucleotídeo <i>Rev</i> (10mM) | 1,5 µL |
| cDNA puro | 3,0 µL |
| H ₂ O miliQ | 7,0 µL |
| Volume final | 25 µL |

O protocolo utilizado no termociclador IQ5 (Bio Rad) também foi exatamente o mesmo para ambos pares de oligonucleotídeos. Os cDNAs utilizados nas PCRs não foram diluídos.

Segue o protocolo de reação utilizado no iQ5:

| Ciclo Número | Repetições | Temperatura | Tempo |
|--------------|------------|-------------------------|--|
| 1 | 0 | 95° C | 5 minutos |
| 2 | 40 | 95° C 50° C 60° C | 20 segundos 15 segundos 1 minuto |
| 3 | 67 | 62-95° C | 45 segundos |

A fluorescência foi detectada na parte 3 do Ciclo 2 e também na parte 1 do ciclo 3, esta última para análise da curva de derretimento do produto gerado. A PCR foi realizada em placas de plástico de 96 poços e seladas com filme adesivo transparente antes de serem levadas ao aparelho.

4.13 Análise da expressão gênica

A quantificação relativa da expressão gênica do suposto gene *mbtb* de *M. massiliense* foi determinada utilizando o método Delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Através deste método, é possível observar as variações na expressão de um gene alvo a partir de um gene de controle interno, chamado de calibrador ou normalizador.

O gene do RNA ribossomal 16S foi escolhido como gene calibrador, como já foi citado anteriormente.

Os resultados obtidos foram tabulados usando o *Microsoft Office Excel 2011* e os gráficos foram feitos utilizando o *Software Prisma* (versão 5.0c, *GraphPad*).

5 RESULTADOS

5.1 Sequenciamento da ORF 9522 de *M. massiliense* GO06

Apesar do sequenciamento completo do genoma da cepa de *M. massiliense* GO06 já ter sido realizado, publicado e depositada no *GeneBank*, faz-se necessário sequenciar novamente o gene *mbtb* para confirmar o sequenciamento realizado em alta escala (RAIOL et al., 2012). O sequenciamento realizado neste estudo apresentou 92% de similaridade com a ORF 9522 descrita no *Massiliense Database* (<http://www.biomol.unb.br/massiliense/database.php?id=2027&table=0>). O alinhamento das sequências obtidas neste trabalho com a ORF 9522 pode ser visualizada no anexo 1.

5.2 Ensaio para detecção da produção de sideróforos utilizando o meio O-CAS

A figura 8 ilustra o ensaio realizado com o meio O-CAS (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007) utilizando culturas com diferentes concentrações do íon ferro (0 μM de Fe, 24 μM de Fe, 60 μM de Fe e 96 μM de Fe) todas inoculadas com *M. massiliense*. A mudança de coloração do meio O-CAS, que é azul, para a cor amarela, indica a produção de sideróforos pela bactéria.

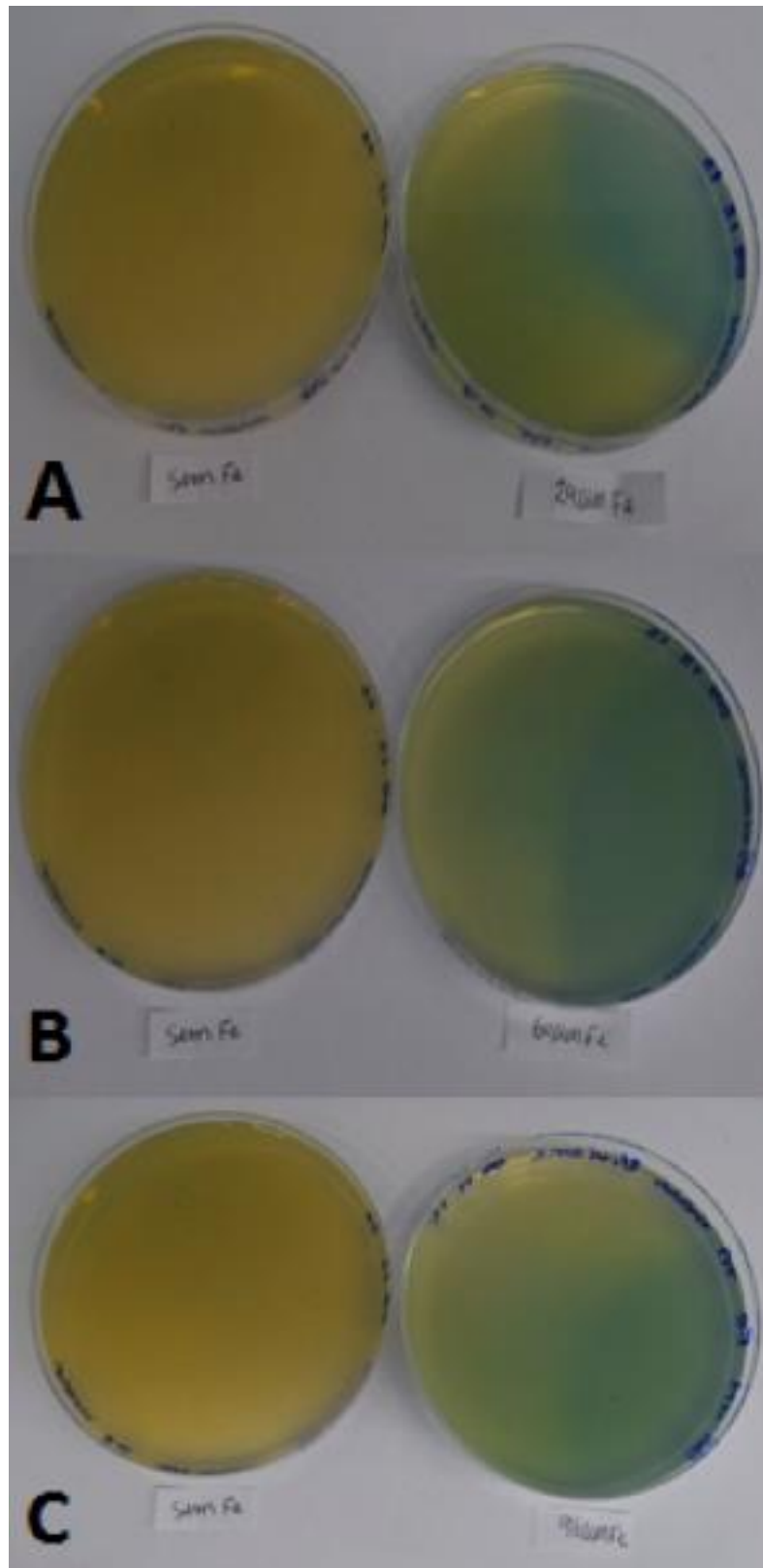


Figura 8. Ensaio O-CAS. Culturas de *M. massiliense* crescidas em meio mínimo sem ferro, placas da esquerda, e nas concentrações de: 24 μ M, 60 μ M e 96 μ M de Fe a direita de A, B e C respectivamente.

Na figura 8 podemos observar que a cultura que não foi suplementada com ferro apresentou mudança da cor azul para a cor amarela em toda a placa, o que indica que houve grande produção de sideróforos, apesar de crescimento bastante reduzido (dados não mostrados). As culturas que foram suplementadas com ferro, apresentaram mudança da cor azul para a cor amarela em mais de 50% da placa, o que também indica que houve produção de sideróforos.

Como este teste não é quantitativo, não é possível estimar em quantas vezes as bactérias crescidas na placa onde a concentração de ferro era nula produziram mais sideróforos que as bactérias que cresceram nos meios que foram suplementados com ferro. O que podemos afirmar é se houve ou não a produção de sideróforos. No entanto, é possível, através da visualização e comparação das placas, observar que a produção de sideróforos por *M. massiliense* foi significativamente maior nas placas que continham o meio insento de ferro.

5.3. Anotações genômicas

Os genes *mbta*, *mbtb*, *mbtc*, *mbtd*, *mbte*, *mbtf* e *mbtg*, envolvidos na montagem das micobactinas, tiveram suas sequências de nucleotídeos comparadas com o genoma da cepa de *M. massiliense* GO06 (RAIOL et al., 2012). As micobactérias que tiveram seus genes pesquisados foram: *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. abscessus* e *M. bovis BCG Pasteur*.

As tabelas 2 e 3 ilustram o percentual de similaridade encontrado entre cada suposta ORF de *M. massiliense* para os genes *mbta-g* e os demais genes já descritos nas micobactérias citadas acima. Foram realizados os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e também da sequência de aminoácidos dos peptídeos codificadas por cada um dos genes analisados.

Os genes *mbta-g* apresentaram alta similaridade com os mesmos genes de *M. abscessus*, com similaridades variando de 95 a 97% e similaridades bem menores com os genes das demais espécies analisadas (tabela 2).

Tabela 2 Porcentagem de similaridade encontrada entre a sequência de nucleotídeos de cada suposta ORF de *M. massiliense* para os genes *mbta-g* e a sequência de nucleotídeos destes mesmos genes, já descritos em cada uma das micobactérias analisadas.

| | <i>mbta</i> 9033 | <i>mbtb</i> 9522 | <i>mbtc</i> 9557 | <i>mbtd</i> 9562 | <i>mbte</i> 9544 | <i>mbtf</i> 9532 | <i>mbtg</i> 9012 |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>M. abscessus</i> | 0,97 | <u>0,97</u> | 0,97 | 0,97 | 0,95 | 0,97 | 0,97 |
| <i>M. smegmatis</i> | 0,64 | <u>0,58</u> | - | 0,36 | 0,39 | 0,41 | 0,53 |
| <i>M. tuberculosis</i> | 0,49 | <u>0,48</u> | 0,58 | 0,48 | 0,39 | 0,41 | 0,7 |
| <i>M. bovis BCG Pasteur</i> | 0,63 | <u>0,48</u> | 0,58 | 0,48 | 0,5 | 0,51 | 0,44 |

Ao analisarmos as sequências de aminoácidos, a similaridade dos peptídeos codificados pelos possíveis genes *mbta-g* de *M. massiliense* com *M. abscessus* fica ainda maior, em torno de 98%. Este número varia apenas para a ORF 9012, que caracteriza o gene *mbtg*, e apresentou similaridade consideravelmente menor, a nível de proteína, sendo esta de 79%. Estes dados podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 Porcentagem de similaridade encontrada entre a sequência de aminoácidos de cada peptídeo codificados pelos supostos genes *mbta-g* de *M. massiliense* com a sequência de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes *mbta-g* já descritas em cada uma das espécies micobacterianas analisadas.

| | <i>mbta</i> 9033 | <i>mbtb</i> 9522 | <i>mbtc</i> 9557 | <i>mbtd</i> 9562 | <i>mbte</i> 9544 | <i>mbtf</i> 9532 | <i>mbtg</i> 9012 |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>M. abscessus</i> | 0,98 | <u>0,98</u> | 0,99 | 0,93 | 0,99 | 0,95 | <u>0,79</u> |
| <i>M. smegmatis</i> | 0,51 | <u>0,49</u> | x | 0,29 | 0,38 | 0,4 | 0,63 |
| <i>M. tuberculosis</i> | 0,6 | <u>0,4</u> | 0,48 | 0,28 | 0,39 | 0,4 | 0,7 |
| <i>M. bovis BCG Pasteur</i> | 0,6 | <u>0,4</u> | 0,48 | 0,28 | 0,39 | 0,4 | 0,45 |

O mapa de distribuição das ORFs de *M. massiliense* e *M. tuberculosis*, que caracterizam os genes *mbta-g* está ilustrado na figura 8. O mapa não está em escala.

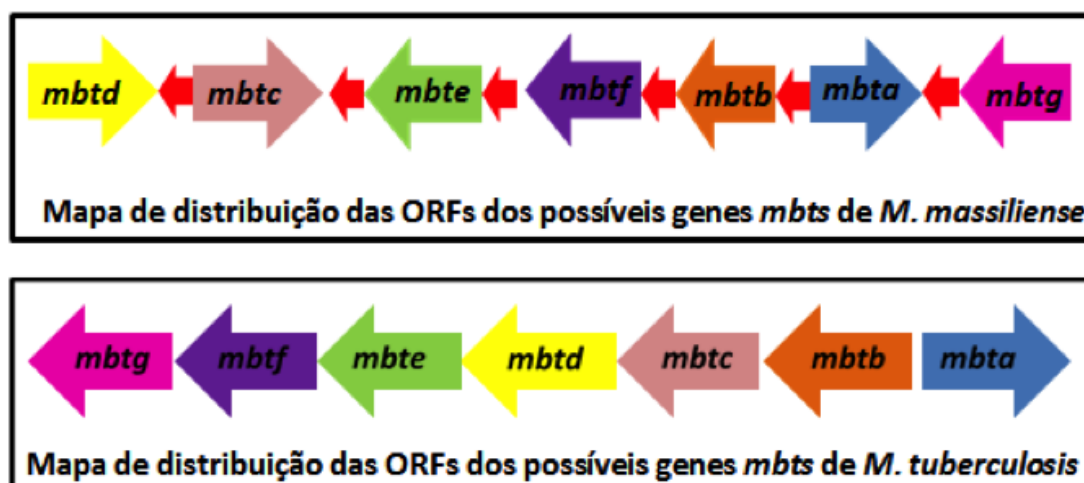


Figura 9. Mapas de distribuição das ORFs *mbta-g* de *M. massiliense* e *M. tuberculosis*.

5.4 Avaliação do crescimento de *M. massiliense* em diferentes concentrações do íon ferro

Para avaliar a necessidade de ferro para o crescimento *in vitro* de *M. massiliense*, culturas em meio mínimo com diferentes concentrações de ferro foram acompanhadas por 19 dias. Na figura 10 podemos observar o gráfico resultante das densidades óticas obtidas nas leituras realizadas ao longo dos dias indicados e nas diferentes concentrações de Fe.

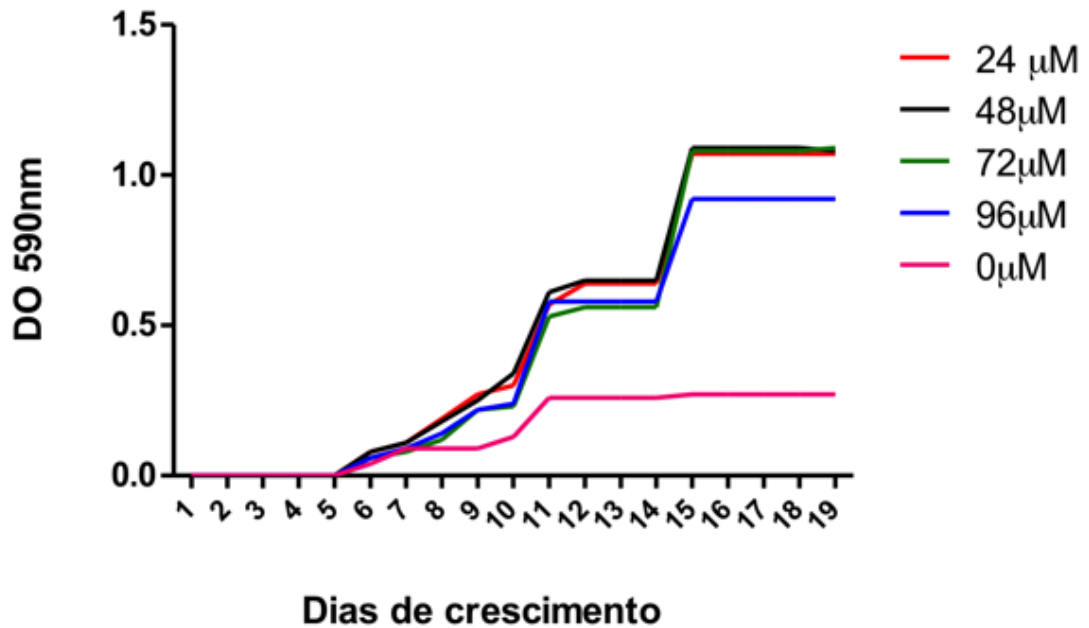


Figura 10. Avaliação do crescimento de *M. massiliense* em diferentes concentrações de Fe a partir das leituras das DOs realizadas em pontos determinados ao longo de todo o experimento.

Podemos observar que, a cultura que não foi suplementada com ferro (0 µM de citrato férrico) apresentou, ao final do experimento, densidade ótica aproximadamente 5 vezes menor que as culturas suplementadas com ferro. As culturas que foram suplementadas com citrato férrico, por sua vez, variaram muito pouco suas densidades óticas com relação às diferentes concentrações de Fe. Apenas a cultura suplementada com 96 µM de Fe apresentou crescimento levemente inferior às demais que receberam a suplementação com ferro.

Os resultados foram submetidos ao teste estatístico Anova que confirmou que a diferença entre o crescimento bacteriano da cultura com 0 µM de ferro e às demais culturas foi significativo após o 15º dia do experimento.

5.5 Avaliação da expressão gênica do *smbtb* na presença e na depleção do íon ferro em culturas de *M. massiliense*

Afim de avaliar as possíveis diferenças na expressão gênica do *smbtb*, realizou-se a reação de PCR em tempo real utilizando-se os cDNAs sintetizados a partir das extrações

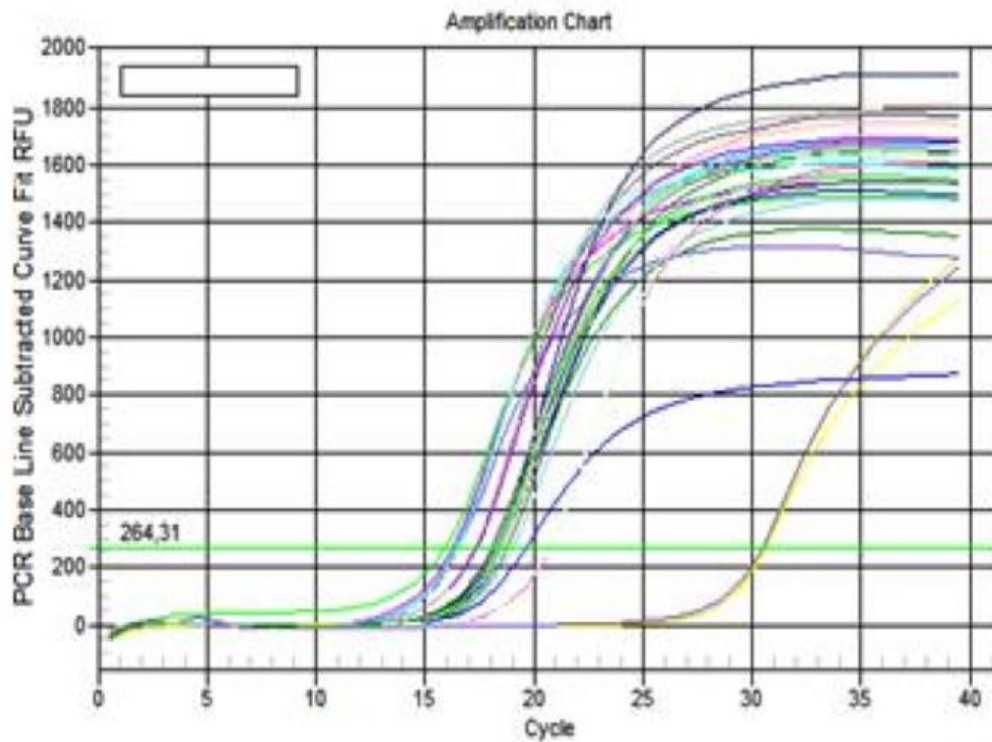
de RNA das bactérias crescidas em diferentes concentrações de citrato férrico. Foram utilizadas duas diferentes concentrações do citrato férrico (72 μM de Fe e 144 μM de Fe), além do meio que não continha este composto (0 μM de Fe).

A figura 11 ilustra a curva de amplificação de uma reação de RT-PCR representativa para o gene 16S, usado como normalizador dos ensaios. Neste, é possível observar o controle negativo (linha amarela) amplificando bem tardiamente. Analisando a curva de *melting* desta reação (figura 12), no entanto, verificamos que não se trata de uma amplificação real do controle negativo, pois não há um pico de derretimento para a linha que representa esta amplificação. Outro controle negativo importante que aparece tardiamente nesta figura (linha lilás) é o controle negativo da síntese de cDNA que nos deu segurança de que a amplificação observada era de cDNA e não de DNA genômico contaminando a amostra.

Para todas as reações de PCR em tempo real realizadas neste estudo consideramos como sendo amplificações positivas àquelas que apresentaram um ciclo threshold (ct), do inglês “threshold cycle”, de no máximo 30. Reações com cts superiores a este valor foram consideradas negativas.

Em todos os gráficos que ilustram as curvas de amplificação a linha horizontal na cor verde corresponde ao ciclo threshold.

PCR Amp/Cycle Chart



PCR Amp/Cycle Chart

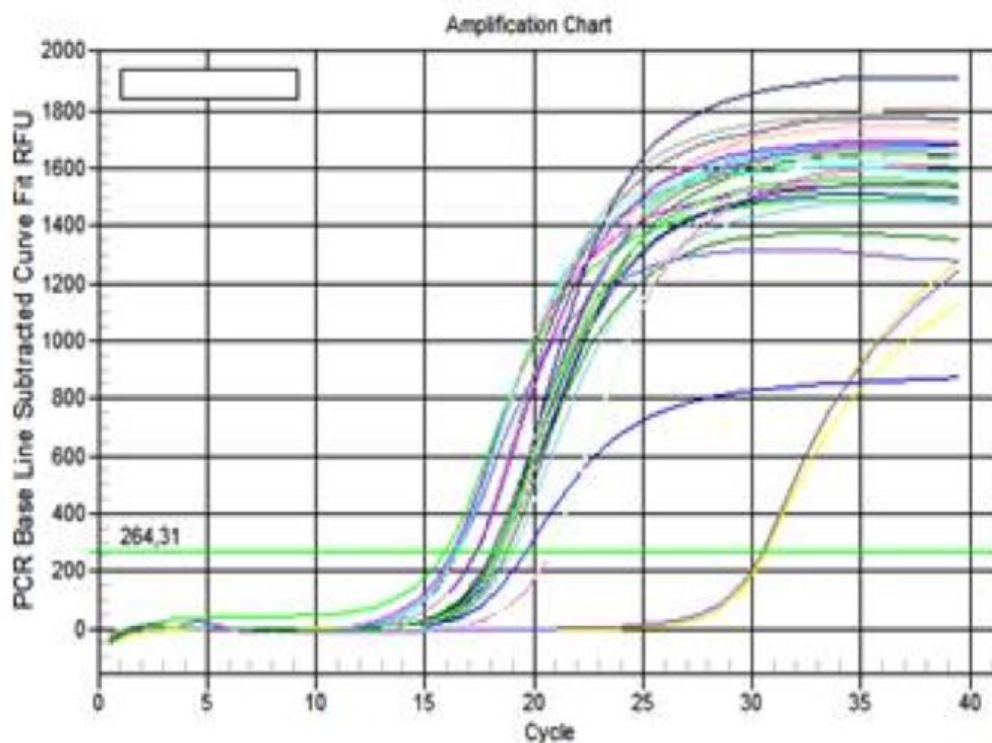


Figura 11. Curva de amplificação da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene *smbtb*, para o gene 16S. Linha amarela: controle negativo. Linha lilás: controle negativo da síntese de cDNA. Demais linhas (cts entre 15 e 21): amplificações resultantes das reações com os cDNAs avaliados.

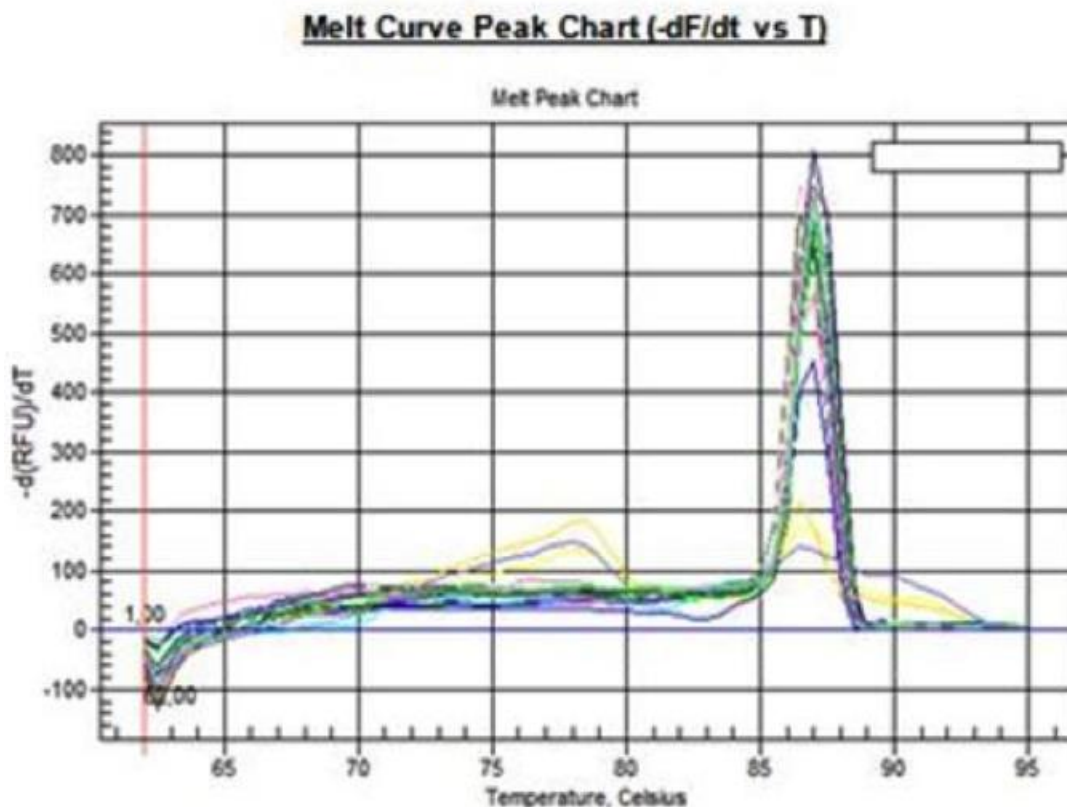


Figura 12. Curva de *Melting* da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene *smbth*, para o gene 16S. Linha amarela: controle negativo. Linha lilás: controle negativo da síntese de cDNA. Demais linhas (cts entre 15 e 21): ampliações resultantes das reações com os cDNAs avaliados.

A figura 13 mostra os níveis de expressão de *smbth*, obtidos após a normalização dos dados utilizando o método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e mostra a variação da expressão gênica deste suposto gene nos dias 5, 9 e 15 do experimento. A normalização foi realizada embasada na expressão de *smbth* observada na primeira coleta de células (dia 5) da cultura que não foi suplementada com ferro (0 μM de Fe).

Já na figura 14, podemos observar a curva de *Melting* resultante da amplificação dos cDNAs deste experimento para o gene *smbth*.

PCR Amp/Cycle Chart

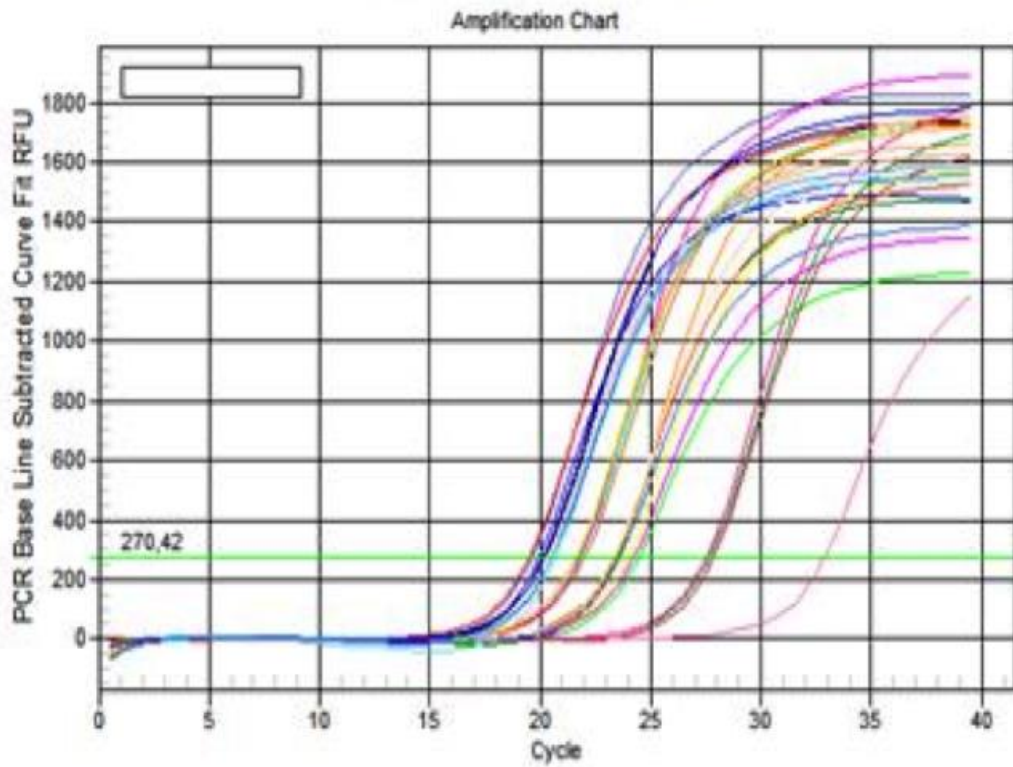


Figura 13. Curva de amplificação da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene *smbtb*, para o gene *smbtb*. Linha rosa claro (ct de aproximadamente 33): controle negativo. Demais linhas: amplificações resultantes das reações com os cDNAs avaliados.

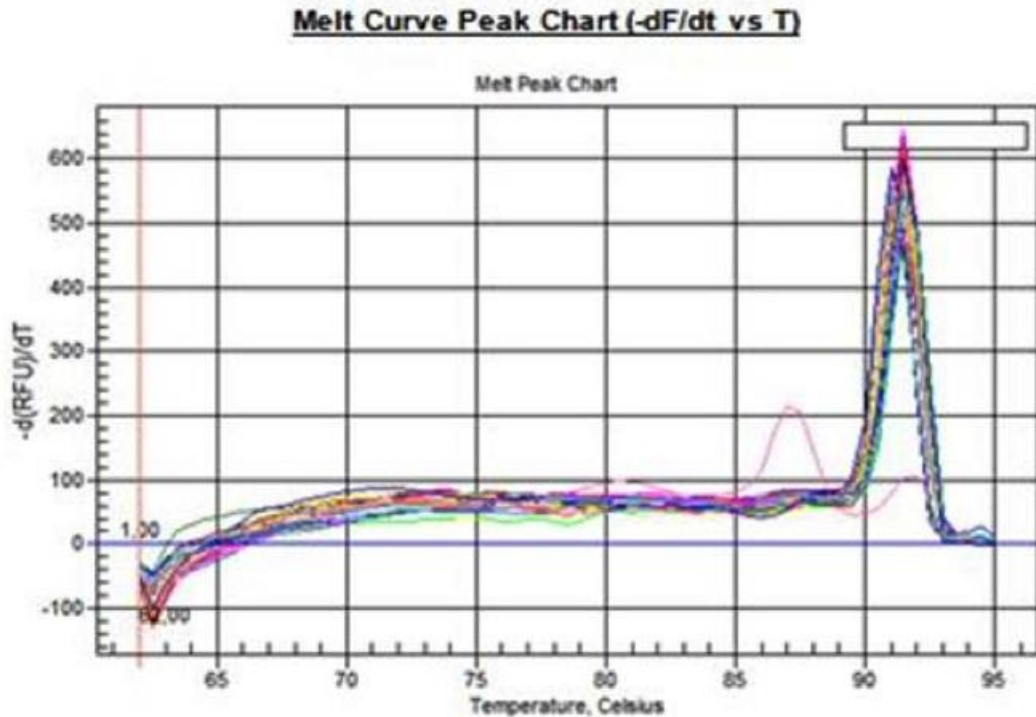


Figura 14. Curva de *Melting* da PCR em tempo real realizada com os cdnas obtidos do experimento para avaliação da expressão do gene *smbtb*, para o gene *smbtb*. Linha rosa claro: controle negativo. Demais linhas: ampliações resultantes das reações com os cDNAs avaliados.

Na figura 15, podemos observar que a expressão relativa do gene *smbtb* aumenta conforme a concentração de ferro no meio também aumenta. Além disso, analisando a expressão deste gene nas diferentes concentrações de ferro, isoladamente, nota-se que esta expressão também aumenta com o passar dos dias.

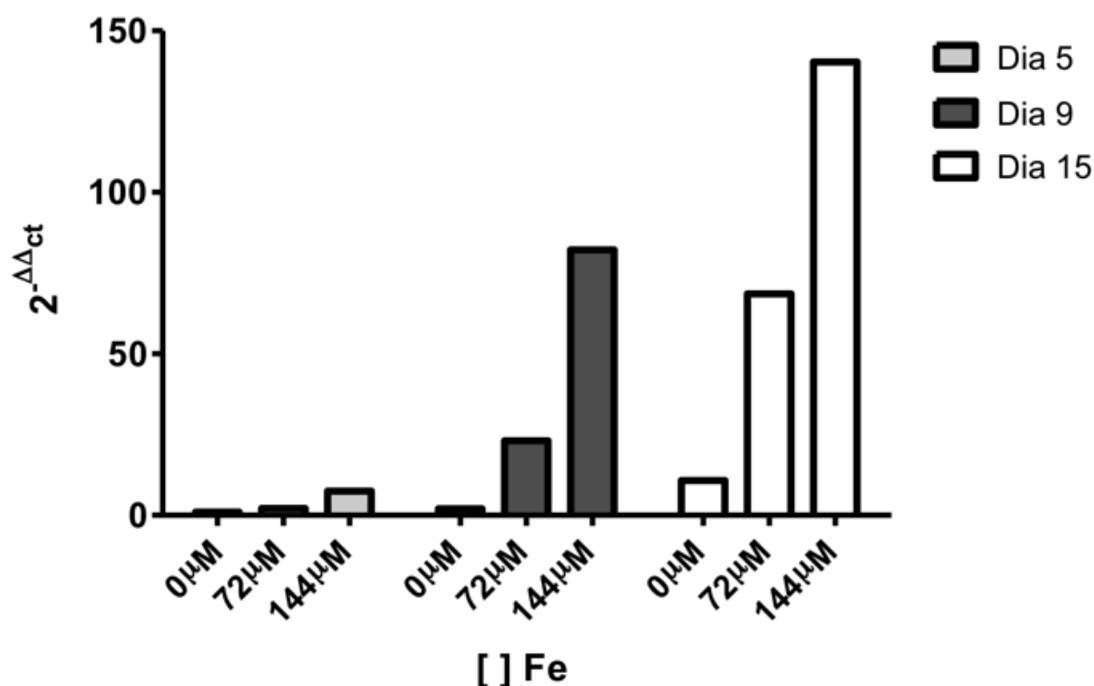


Figura 15. Expressão relativa de *smbtb* em diferentes concentrações de ferro e em diferentes momentos do crescimento de *M. massiliense in vitro*.

5.6. Avaliação da expressão gênica do *smbtb* em camundongos C57Bl/6 infectados com *M. massiliense* e submetidos à depleção ou à suplementação com ferro

Com o objetivo de avaliar a expressão do gene *smbtb* de *M. massiliense in vivo*, em diferentes condições de disponibilidade de ferro, camundongos foram submetidos a injeção de ar em seu dorso para formação de bolsões de ar para permitir a inoculação de *M. massiliense* e posterior recuperação das bactérias para análises. A eutanásia dos camundongos e posterior recuperação das bactérias a partir do lavado dos bolsões de ar de cada camundongo deu-se três dias após o dia em que a infecção foi realizada. O RNA extraído das células presentes no lavado retirado dos bolsões de ar de cada camundongo foi submetido à síntese de cDNA e posterior realização de PCR em tempo real para os genes 16S e *smbtb*.

A curva de amplificação desta PCR pode ser visualizada na figura 16. Nela, podemos observar uma amplificação tardia do controle negativo que confirmamos não se tratar de uma amplificação real devido a inexistência de um pico na curva de *Melting* para esta amplificação.

A figura 17 ilustra a curva de melting obtida na PCR em tempo real realizada para o gene 16S.

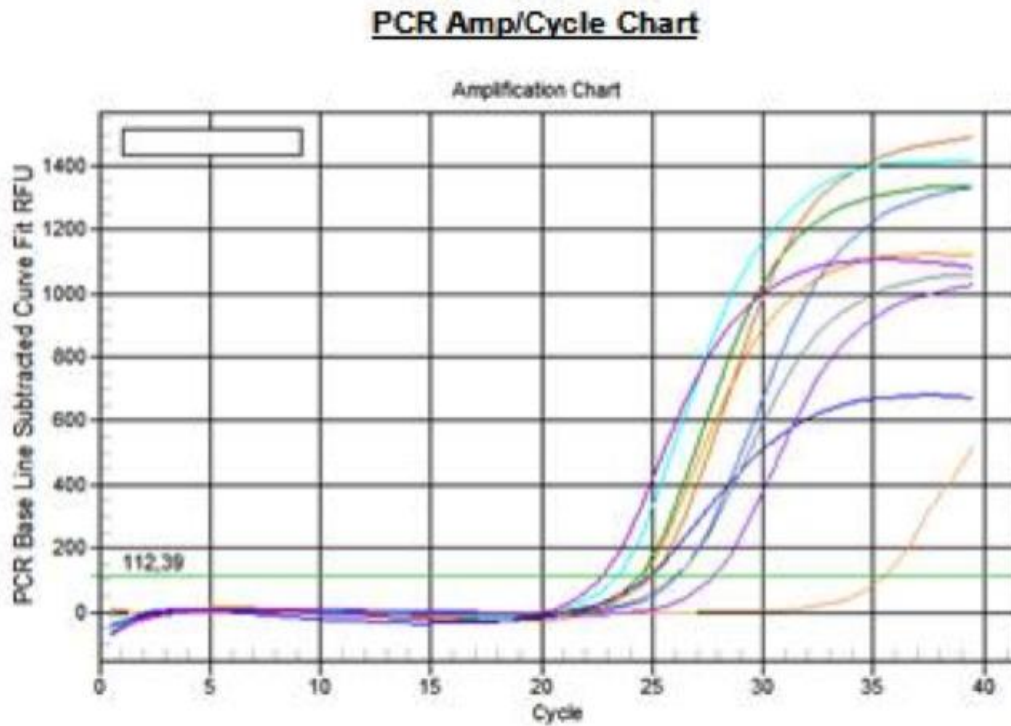


Figura 16. Curva de amplificação da pcr em tempo real realizada para o gene 16S, utilizando os cdnas sintetizados a partir dos RNAs extraídos das células do lavado do bolsão de ar dos camundongos utilizados no experimento *in vivo* deste estudo. Linha rosa claro: Controle negativo. Demais linhas: Amplificações resultantes dos cDNAs testados.

Melt Curve Peak Chart (-dF/dt vs T)

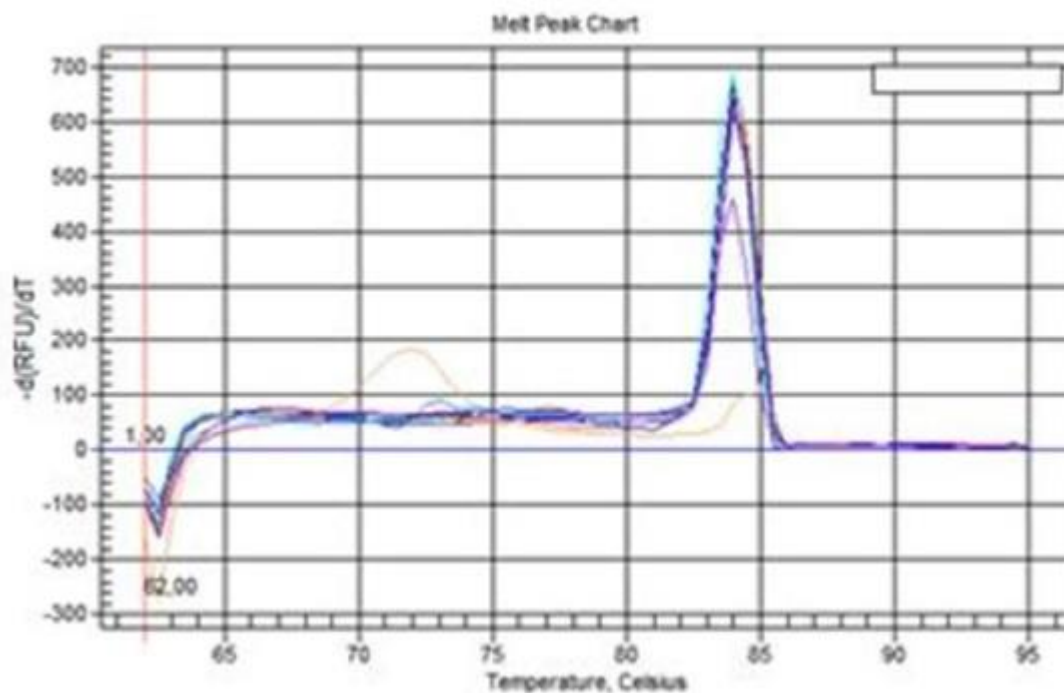


Figura 17. Curva de *Melting* obtida na amplificação dos cdnas sintetizados a partir dos rnas extraídos das células do lavado dos bolsões de ar dos camundongos utilizados no experimento *in vivo* deste estudo, para o gene 16S. Linha rosa claro: Controle negativo. Demais linhas: Amplificações resultantes dos cDNAs testados

Os mesmos cDNAs utilizados na PCR em tempo real ilustrada nas figuras 16 e 17 foram testados para o gene *smbtb*. As curvas de amplificação e a curva de *Melting* desta PCR podem ser visualizadas nas figuras abaixo, 18 e 19 respectivamente.

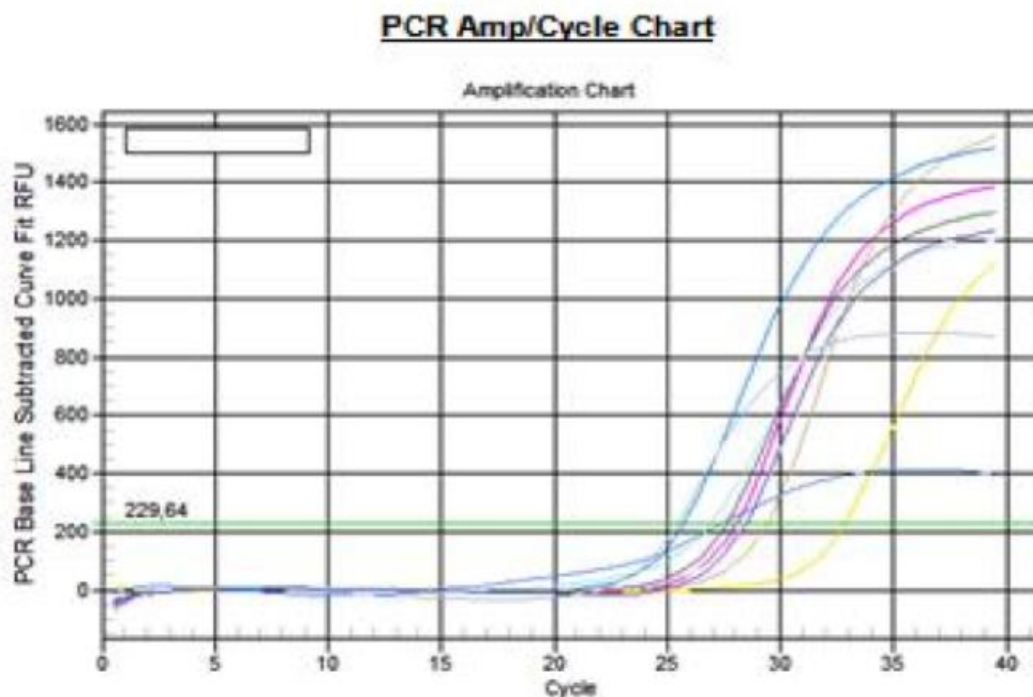


Figura 18. Curva de amplificação da PCR em tempo real realizada para o gene *smbtb*, utilizando os cDNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos das células do lavado do bolsão de ar dos camundongos utilizados no experimento *in vivo* deste estudo. Linha amarela: Controle negativo. Demais linhas: ampliações resultantes dos cDNAs testados.

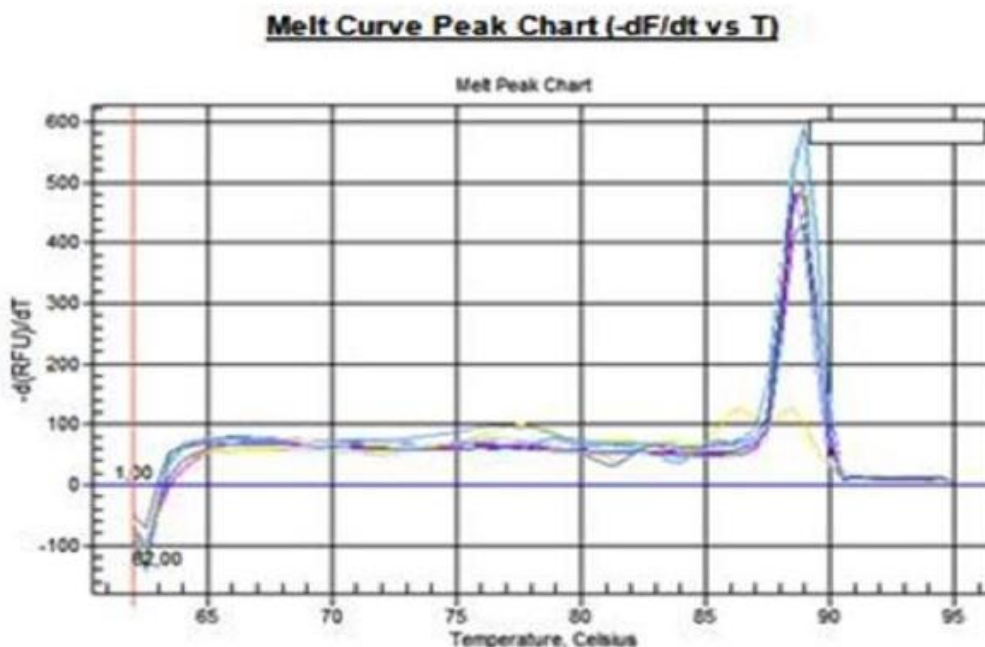


Figura 19. Curva de *Melting* obtida na amplificação dos cDNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos das células do lavado do air-pouch dos camundongos utilizados no experimento *in vivo* deste estudo, para o gene *smbtb*. Linha amarela: Controle negativo. Demais linhas: ampliações resultantes dos cDNAs testados

A figura 20 mostra os níveis de expressão de *smbtb*, obtidos após a normalização dos dados utilizando o método $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e mostra a variação da expressão gênica deste suposto gene entre os três diferentes grupos deste experimento (PBS, DFO e FERRO) ao final do mesmo. A normalização foi realizada embasada na expressão de *smbtb* observada no grupo controle (PBS).

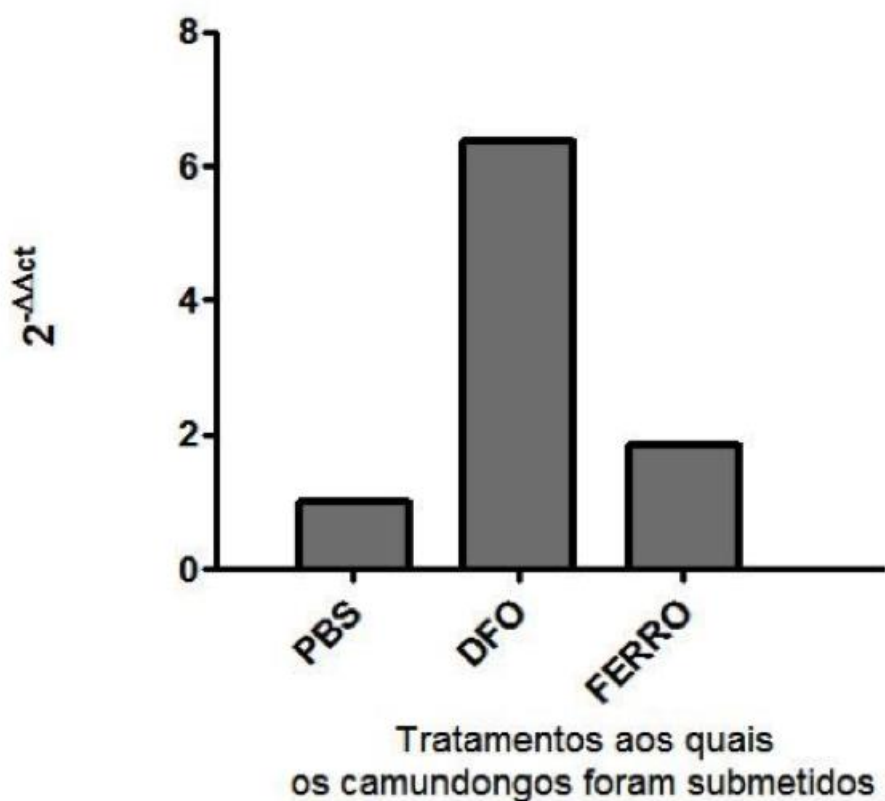


Figura 20. Expressão relativa de *smbtb* em camundongos C57Bl/6 submetidos à tratamentos de depleção ou suplementação com ferro e infectados com *M. massiliense*.

Na figura 20, podemos observar que a expressão relativa do gene *smbtb* foi aproximadamente duas vezes maior no grupo Ferro, em relação ao grupo controle (PBS), enquanto que a expressão relativa deste gene no grupo DFO apresentou um aumento bastante significativo, mostrando uma expressão mais de seis vezes maior em relação ao grupo PBS.

6 DISCUSSÃO

A etapa inicial deste trabalho foi a realização do ensaio com o meio de sobreposição O-CAS (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007) a fim de verificar se a produção de sideróforos seria um fato real em *M. massiliense*. Por meio dos resultados deste ensaio foi possível confirmar que *M. massiliense* realmente produz sideróforos. Na figura 8 podemos visualizar a completa mudança de cor na placa onde não foi feita a suplementação do meio com ferro.

Sabemos que as micobactinas fazem parte da classe dos sideróforos mistos, ou seja, possuem grupos hidroxamatos e catecolatos (MIETHKE; MARAHIEL, 2007; WENCEWICZ et al., 2009). Sabemos também que a cor apresentada pelo meio de sobreposição O-CAS (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007; SCHWYN; NEILANDS, 1987) quando há produção de sideróforos depende do tipo de sideróforo produzido pelo microrganismo que está sendo testado. Sideróforos do tipo catecol em geral mudam a coloração do O-CAS de azul para rosa enquanto que, sideróforos do tipo hidroxamato mudam a coloração do O-CAS de azul para alaranjado (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007). Não há uma cor definida para a qual o meio O-CAS mude quando bactérias que apresentam sideróforos mistos, como *Mycobacterium tuberculosis*, são testadas.

No entanto, um estudo realizado em 2007 (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007) mostrou a mudança de cor provocada pela produção de sideróforos em *Bacillus cereus*, que produz sideróforos do tipo hidroxamato, para uma cor que se aproxima muito daquela que visualizamos em nosso ensaio. Além disso, esse estudo provou que a cor amarela também pode ser observada na mudança da coloração do O-CAS para algumas cepas, o que ainda não havia sido observado por nenhum outro estudo. Esses dados podem ser visualizados na figura 21.

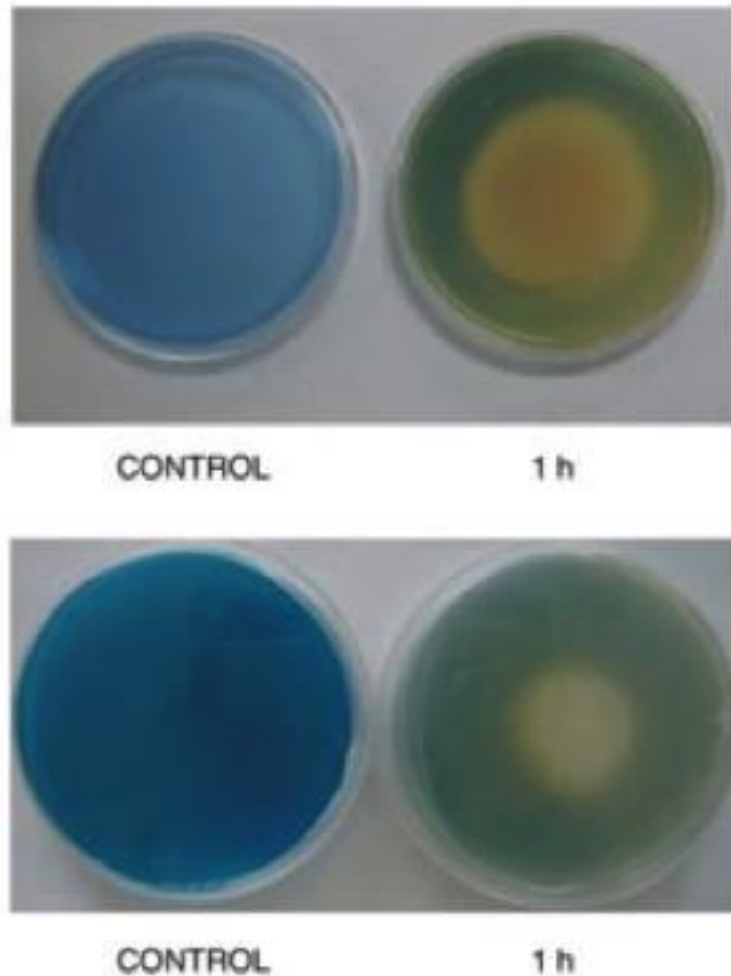


Figura 21. Ensaio O-CAS. O controle não apresentou mudança na coloração e a reação positiva foi avaliada após 1 hora. A figura superior trata-se de uma placa inoculada com *Bacillus cereus* e a figura inferior trata-se de uma placa inoculada com *Rhizopus oligosporus* (PÉREZ-MIRANDA et al., 2007).

Não podemos afirmar que sideróforos mistos geram uma mudança de cor de azul para amarelo quando testados com o ensaio O-CAS já que apenas *M. massiliense* foi avaliado mas é possível afirmar que a produção de sideróforos por esta bactéria realmente ocorre e, além disso, ocorre mais intensamente em meios não suplementados com ferro. Termos que se referem apenas à observações feitas a olho nu, como o termo “intensamente” citado na frase anterior, são geralmente usados para avaliar os resultados deste ensaio já que, através da visualização das placas é possível dizer apenas se a produção de sideróforos é maior ou menor no microrganismo testado pois o ensaio não é quantitativo.

Com relação às placas suplementadas com ferro, em todas as concentrações (24, 60 e 96 μM de Fe) observamos mudança na coloração do O-CAS para amarelo, no

entanto, esta mudança não foi observada em toda a placa, como ocorreu no meio onde a concentração de ferro foi de 0 μM .

Após a confirmação de que *M. massiliense* realmente produz sideróforos, procedemos a realização dos estudos *in silico* a fim de avaliar se haveriam similaridades entre os genes envolvidos na produção de peptídeos que realizam a montagem das micobactinas (*mbta-mbti*) já descritos em *M. tuberculosis* e as ORFs que supostamente codificariam estes genes em *M. massiliense*.

Como podemos observar na tabela 2, o alinhamento da sequência de aminoácidos dos peptídeos de *M. tuberculosis* e os supostos peptídeos de *M. massiliense*, mostrou que todos os genes *mbts* de *M. tuberculosis*, exceto o *mbtd*, apresentaram mais de 40% de similaridade na sequência de aminoácidos com os supostos *mbts* de *M. massiliense*. Esse foi o ponto inicial para a ideia e para o embasamento deste estudo.

Além disso, outros pontos podem ser destacados como resultados produtivos desta análise *in silico*. O primeiro deles se trata da ORF 9012 de *M. massiliense*, provável *mbtg* desta bactéria, que apresentou em sua sequência proteica similaridade bem menor (~80%) com o *mbtg* de *M. abscessus*, quando comparada as demais ORFs de *M. massiliense* que foram comparadas com os *mbts* de *M. abscessus*.

Outro ponto importante foi que a análise global da comparação de todas as ORFs que supostamente codificariam os *mbts* de *M. massiliense*, apresentou similaridades superiores a 40% para todas as comparações com os *mbts* de *M. tuberculosis*. Esta análise reforça a necessidade de se aumentarem os estudos nesse contexto a fim de explorar e consolidar as evidências de que *M. massiliense* realmente produza sideróforos semelhantes às micobactinas já descritas em *M. tuberculosis*.

Além deste alinhamento, realizamos também o sequenciamento com oligonucleotídeos específicos para a ORF 9522 (*smbtb*) utilizando o isolado alvo deste estudo (GO06), a fim de confirmar a identidade do isolado armazenado em nosso laboratório com a sequência já descrita. O alinhamento da sequência obtida em nossa análise com a sequência descrita apresentou similaridade muito próxima a 100% o que confirma a correspondência do isolado utilizado neste estudo com àquele encontrado quando do sequenciamento do genoma de *M. massiliense* (RAIOL et al., 2012).

Seguindo esta linha de raciocínio, e propondo avaliar primeiramente a influência do íon ferro no crescimento de *M. massiliense*, realizamos um ensaio no qual *M. massiliense* foi inoculado em culturas com diferentes concentrações de ferro, inclusive na ausência deste íon. A avaliação da influência do íon Fe no crescimento de micobactérias é algo que mostra dificuldade na obtenção de resultados consistentes. Pode-se observar que, na literatura, algumas micobactérias como *M. smegmatis*, já tiveram seu crescimento em diferentes concentrações do íon ferro avaliado e não apresentaram nenhuma influência conclusiva deste íon no crescimento deste bacilo (WENDEL et al., 2013).

No entanto, no ensaio realizado neste estudo, o acompanhamento desse crescimento através da leitura das DOs deixou claro que a disponibilidade do íon ferro no meio influencia positivamente o crescimento de *M. massiliense*, fato que pode ser visualizado na figura 9.

O estudo de Roberts et al (2012) realizou uma avaliação semelhante onde espécies de *Salinispora* foram cultivadas em meios pobres e ricos em ferro. Neste estudo, estas espécies tiveram um dos genes provavelmente envolvidos em sua biosíntese de sideróforos deletado e as bactérias com esta deleção demoraram cerca de dois meses para crescer em meio pobre em ferro. Quando este meio foi suplementado com ferro, o crescimento da mesma espécie contendo a deleção deu-se em duas semanas. Enquanto isso, uma bactéria sem a deleção cresceu em meio rico em ferro em aproximadamente uma semana (ROBERTS et al., 2012).

Existe uma grande necessidade de ferro para que a bactéria permaneça viável para seus processos metabólitos. Porém em nossos ensaios, todas as concentrações de ferro testadas resultaram em crescimento semelhante, ou seja não observamos uma relação entre taxa de crescimento e concentração de ferro nas concentrações de 24 a 96 μM .

O experimento realizado *in vitro*, para avaliar a expressão do gene *smbtb* na ausência e em diferentes concentrações do íon ferro, mostrou resultados opostos àqueles que esperávamos quando o experimento foi desenhado. Como já foi demonstrado que, em *M. tuberculosis*, o gene *mbtb* participa da montagem das micobactinas (QUADRI et al., 1998). Nossa suposição inicial era de que a expressão deste gene aumentaria

consideravelmente quando *M. massiliense* fosse cultivado na ausência do íon ferro e que, seguindo a mesma tendência, a expressão deste gene diminuiria conforme aumentássemos a disponibilidade de ferro à bactéria.

No entanto, como pode ser observado na figura 15, ao final do experimento, a expressão do gene *smbtb* aumentou mais de vinte vezes em relação a expressão deste mesmo gene quando *M. massiliense* foi cultivado na ausência do íon ferro.

Apesar de intrigante, quando pensamos que, além da simples captação do ferro para que este seja prontamente utilizado no metabolismo bacteriano, este íon pode ser captado por outros diferentes motivos, a expressão aumentada do gene *smbtb*, conforme a disponibilidade do ferro também aumenta, apresenta suposições que são totalmente plausíveis e adequadas.

Em *M. tuberculosis* é sabido que mais de 90% do ferro captado é estocado e, além disso, que as micobactinas podem armazenar excesso de ferro mas que a “estação final” de armazenamento são as bacterioferritinas (MATZANKE et al., 1997). Estudos já demonstraram que a transcrição dos genes *bfra* e *bfrb* em *M. tuberculosis* é induzida em meios com alta concentração de ferro (RODRIGUEZ et al., 2002) e que, esta mesma transcrição é reduzida em meios com privação de ferro (GOLD et al., 2001).

Diante disso e, de posse dos resultados obtidos em nosso estudo, supomos que a expressão do gene *smbtb* esteja aumentando conforme a disponibilidade do íon ferro no meio também aumenta com o objetivo de cumprir dois propósitos: aumentar a síntese de carboximicobactina e micobactina para atuarem na estocagem de ferro ao “entregarem” este íon para as prováveis bacterioferritinas de *M. massiliense* e manter a homeostasia do meio afim de evitar a formação de reativos tóxicos para a bactéria, fato que também já foi provado acontecer em *M. tuberculosis* (RODRIGUEZ; SMITH, 2003)

Realizamos o alinhamento da sequência das proteínas codificadas pelos genes *bfra* e *bfrb* em *M. tuberculosis*, contra o genoma de *M. massiliense* GO06 e encontramos regiões com 67% de similaridade entre as sequências das duas micobactérias para o gene *bfrb*. O gene *bfra*, no entanto, não apresentou similaridade em nenhuma região entre a sequência descrita em *M. tuberculosis* e o genoma de *M. massiliense* GO06.

Esta análise suporta a ideia de que *M. massiliense* realmente produziria bacterioferritinas, muito provavelmente da classe das Bfrbs de *M. tuberculosis* e, caso *M. massiliense* esteja sintetizando uma outra molécula para estocagem de ferro, não seria semelhante à Bfra de *M. tuberculosis*. Outra suposição seria a de que, talvez *M. massiliense* seja capaz de estocar o ferro na própria micobactina, através de mecanismos ainda desconhecidos.

Ainda existem poucos estudos acerca da regulação dos genes envolvidos na síntese de sideróforos, não apenas em *M. tuberculosis* mas nas bactérias em geral. No entanto, alguns trabalhos sobre este assunto evidenciam a dificuldade no entendimento dos resultados pois estes muitas vezes contradizem o que se espera acontecer. O estudo citado anteriormente, sobre os possíveis genes envolvidos na síntese de sideróforo em espécies de *Salinispora* apresentou o resultado esperado para um dos genes, o gene *des*, que foi expresso quando a bactéria foi cultivada em limitação de ferro, enquanto que não houve expressão quando as mesmas espécies foram cultivadas em meio enriquecido com ferro (ROBERTS et al., 2012).

Neste mesmo estudo, um outro gene, também envolvido na síntese de sideróforos, o gene *sid2*, foi expresso quando cultivado em condições de depleção de ferro em uma das espécies de *Salinispora* (*S. Tropica* CNB440) e também apresentou expressão quando uma outra espécie de *Salinispora* (*S. Arenicola* CNS 205) foi cultivada em meio enriquecido com ferro (ROBERTS et al., 2012).

Relacionando os resultados do ensaio realizado com o meio O-CAS com os resultados do ensaio onde a expressão do *smbtb* foi avaliada *in vitro*, é plausível pensar que a produção de sideróforos nos meios suplementados com ferro esteja ocorrendo a fim de promover a estocagem deste íon, como já foi discutido anteriormente.

O experimento realizado *in vivo* para a avaliação da expressão do gene *smbtb* na presença e na depleção do íon ferro apresentou resultados diferentes daqueles observados no experimento realizado *in vitro* para essa mesma avaliação.

Como podemos observar na figura 20 os camundongos tratados com o quelante deferoxamine apresentaram um aumento na expressão do gene *smbtb* maior que 6 vezes em relação à expressão deste gene no grupo controle. Muito provavelmente, este significativo aumento se deve à real necessidade de *M. massiliense* de produzir as

micobactinas para a captação do ferro, já que tanto esta bactéria quanto o camundongo precisam deste íon para a manutenção de seus metabolismos. Como o ferro se encontra em baixas concentrações no grupo quelante, a competição pela captação deste íon se torna ainda mais intensa nessas condições.

Relacionando os resultados obtidos no experimento *in vivo* àqueles observados no experimento *in vitro*, o aumento da expressão do gene *smbtb* observado em *M. massiliense* quando esta bactéria se encontra infectando o hospedeiro, não foi observado nas culturas que não foram suplementadas com ferro. Este aumento possivelmente não é visualizado nos experimentos *in vitro* devido à ausência da competição estabelecida pela bactéria e as proteínas de captação de ferro do hospedeiro durante a infecção, o que torna a síntese das micobactinas essencial para que a bactéria seja capaz de competir com o organismo do hospedeiro e garantir o ferro para a manutenção do seu metabolismo.

O grupo de camundongos que foi suplementado com o íon ferro também apresentou um aumento de quase duas vezes na expressão do gene *smbtb*. Este aumento, inferior àquele observado no grupo controle, talvez se deva ao mesmo motivo pelo qual supomos que ocorre o aumento na expressão do gene *smbtb* nas culturas suplementadas com ferro, observado no experimento *in vitro*. Como, neste caso, o íon ferro está em excesso, supomos que o gene *smbtb* está sendo levemente mais expresso, em relação ao grupo controle, devido à necessidade das micobactinas atuarem na captação deste ferro para posterior armazenamento pelas bacterioferritinas.

Até o momento, não há na literatura estudos que avaliem a expressão de nenhum dos supostos mbts de *M. massiliense in vivo*, no entanto, o estudo de Dubnau et al, realizado em 2004, avaliou alguns genes de *Mycobacterium tuberculosis* que, supostamente teriam sua expressão regulada positivamente durante a infecção em camundongos Balb/c. Naquele estudo, o RNA foi extraído do pulmão de 3 camundongos infectados e a expressão dos genes *bfra* e *bfrb*, responsáveis pela síntese das bacterioferritinas em *M. tuberculosis*, foi avaliada por PCR em tempo real. Observou-se que os genes *brfa* e *brfb* não foram expressos em altos níveis nos pulmões dos camundongos avaliados. No entanto, este estudo não realizou testes com camundongos suplementados com ferro.

Além deste estudo, já foi demonstrado também que o gene *mbtb* é superexpresso nos pulmões de camundongos submetidos às condições de depleção do íon ferro e infectados com *M. tuberculosis*, o que coincide com os resultados que observamos para o gene *smbtb*, de *M. massiliense*, para o grupo de camundongos que foi tratado com o quelante deferoxamine (GOLD et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2002).

Compreender o mecanismo de regulação dos genes envolvidos na síntese das micobactinas trata-se de uma questão que permanece obscura até mesmo em *M. tuberculosis*. Em 2012, um estudo propôs um novo modelo de biossíntese das micobactinas onde outros dois tipos de micobactinas, chamadas pelos autores de monodeoximicobactina e carboxideoximicobactina, seriam sintetizadas devido uma alteração na via de ativação dos genes *mbts* (MADIGAN et al., 2012).

Sendo assim, é possível perceber o quão complexo é o entendimento das vias de regulação da captação e estocagem do ferro não apenas em *M. tuberculosis* mas também nas demais micobactérias, inclusive em *M. massiliense*, alvo deste estudo.

7 CONCLUSÕES

Após todas as análises realizadas neste trabalho, concluímos que *M. massiliense* produz sideróforos e que estes, muito provavelmente, são semelhantes às micobactinas produzidas por *M. tuberculosis*.

Além disso, podemos afirmar que o ferro influencia positivamente o crescimento de *M. massiliense* e que a expressão do suposto gene *smbtb* desta micobactéria aumenta conforme a disponibilidade de ferro no meio em que a mesma se encontra. Este fato deve-se, possivelmente, à mecanismos para estocagem de ferro (ainda não estudados), inerentes à *M. massiliense*.

Com relação aos estudos realizados *in vivo*, análises posteriores precisam serem realizadas, no entanto, acreditamos que a expressão de *smbtb* aumente em condições de depleção de ferro quando *M. massiliense* se encontra infectando um hospedeiro, devido à real necessidade desta bactéria de competir com este hospedeiro pelo ferro e garantir sua sobrevivência.

Estudos que envolvam os demais genes *mbts* provavelmente envolvidos na síntese dos sideróforos ainda precisam serem realizados, inclusive maiores estudos acerca do gene *mbtb*, que possibilitem elucidar o mecanismo de regulação da captação e estocagem de ferro em *M. massiliense*. No entanto, consideramos que este trabalho trata-se de um passo inicial extremamente importante e promissor ao nos mostrar que *M. massiliense* produz sideróforos e que o *mbtb*, um dos genes envolvidos na síntese das micobactinas em *M. tuberculosis*, também é expresso naquela bactéria.

8 REFERÊNCIAS

- ADÉKAMBI, T. et al. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. Pt 1, p. 133–43, jan. 2006.
- ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, p. 2095–2105, 2004.
- ADILAKSHMI, T.; AYLING, P. D.; RATLEDGE, C. Mutational Analysis of a Role for Salicylic Acid in Iron Metabolism of *Mycobacterium smegmatis*. v. 182, n. 2, p. 264–271, 2000.
- ANDREWS, S. C. Iron storage in bacteria. **Advances in microbial physiology**, v. 40, p. 281–351, 1998.
- BARELMANN, I. et al. The structures of the pyoverdins from two *Pseudomonas fluorescens* strains accepted mutually by their respective producers. **Z Naturforsch C**, v. 57, n. 1-2, p. 9–16, 2002.
- BOELAERT, J. R. et al. The effect of the host's iron status on tuberculosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 12, p. 1745–53, 15 jun. 2007.
- BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. v. 99, n. 6, 2002.
- BRYANT, J. M. et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. **Lancet**, v. 381, n. 9877, p. 1551–60, 4 maio 2013.
- CAMUS, J.-C. et al. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, p. 2967–73, 2002.
- CARDOSO, A. M. et al. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 10, n. 14-15, p. 1552–7, 2008.
- CHADHA, R. et al. An outbreak of postsurgical wound infections due to *Mycobacterium abscessus*. **Pediatric Surgery International**, v. 13, p. 406–410, 1998.
- CHALLIS, G. L. A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. **ChemBiochem**, v. 6, n. 4, p. 601–11, 2005.

- CHEN, F.-C. et al. Pros and cons of the tuberculosis drugome approach - an empirical analysis. **PLoS one**, v. 9, n. 6, p. e100829, jan. 2014.
- CHO, A. Y. et al. Identification of Cutaneous Mycobacterium massiliense Infections Associated with Repeated Surgical Procedures. **Annals of dermatology**, v. 22, n. 1, p. 114–8, fev. 2010.
- CHOI, G.-E. et al. Macrolide treatment for Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense infection and inducible resistance. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 186, n. 9, p. 917–25, 1 nov. 2012.
- CHOI, K. H. et al. A Fatal Case of Acute Respiratory Failure Caused by Mycobacterium massiliense. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 74, n. 2, p. 79–81, mar. 2013.
- CHU, B. C. et al. Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 23, n. 4, p. 601–11, ago. 2010.
- CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 40, p. 151–182, 2003.
- COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537–544, 1998.
- COLOMBO, R. E.; OLIVIER, K. N. **Diagnosis and treatment of infections caused by rapidly growing mycobacteria** Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine, 2008.
- CONVILLE, P. S.; WITEBSKY, F. G. Variables affecting results of sodium chloride tolerance test for identification of rapidly growing mycobacteria. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, p. 1555–1559, 1998.
- COOK, J. D. et al. Effect of Fiber on Nonheme Iron Absorption. **Gastroenterology**, v. 85, p. 1354–1358, 1983.
- CORNELIS, P.; HOHNADEL, D.; MEYER, J. M. Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among Pseudomonas aeruginosa strains. **Infection and immunity**, v. 57, p. 3491–3497, 1989.
- COUSINS, D. V. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the Mycobacterium tuberculosis complex: Mycobacterium pinnipedii sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1305–1314, 1 set. 2003.
- CROSA, J. H.; WALSH, C. T. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, p. 223–249, 2002.

- DE CHIAL, M. et al. Identification of type II and type III pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 149, p. 821–831, 2003.
- DUARTE, R. S. et al. Epidemic of postsurgical infections caused by *Mycobacterium massiliense*. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2149–55, jul. 2009.
- DUSSURGET, O. et al. Transcriptional control of the iron-responsive *fxbA* gene by the mycobacterial regulator IdeR. **Journal of bacteriology**, v. 181, p. 3402–3408, 1999.
- DUSSURGET, O.; RODRIGUEZ, M.; SMITH, I. An *ideR* mutant of *Mycobacterium smegmatis* has derepressed siderophore production and an altered oxidative-stress response. **Molecular microbiology**, v. 22, p. 535–544, 1996.
- ESTEBAN, J. et al. Biofilm development by potentially pathogenic non-pigmented rapidly growing mycobacteria. v. 8, p. 1–8, 2008.
- FINKING, R.; MARAHIEL, M. A. Biosynthesis of nonribosomal peptides1. **Annual review of microbiology**, v. 58, p. 453–488, 2004.
- GAO, Y. et al. Mechanism of protective effects of Danshen against iron overload-induced injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 254–260, 2013.
- GASPAR, E. B.; SAKAI, Y. I.; GASPARI, E. DE. A mouse air pouch model for evaluating the immune response to *Taenia crassiceps* infection. **Experimental parasitology**, v. 137, p. 66–73, fev. 2014.
- GEHRING, A. M.; BRADLEY, K. A.; WALSH, C. T. Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: Isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by ente using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. **Biochemistry**, v. 36, p. 8495–8503, 1997.
- GHYSELS, B. et al. FpvB, an alternative type I ferripyoverdine receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 150, p. 1671–1680, 2004.
- GOBIN, J.; HORWITZ, M. A. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, p. 1527–1532, 1996.
- GOLD, B. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. **Molecular microbiology**, v. 42, n. 3, p. 851–65, nov. 2001.
- GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro : uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase Iron metabolism : an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. 2008.
- GRÜNEWALD, J.; MARAHIEL, M. A. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 70, p. 121–146, 2006.

- GUERINOT, M. L. Microbial iron transport. **Annual review of microbiology**, v. 48, p. 743–772, 1994.
- HAMAMOTO, T. et al. Bacteremia due to *Mycobacterium massiliense* in a patient with chronic myelogenous leukemia: case report. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, n. 2, p. 183–5, out. 2012.
- HARRISON, F.; BUCKLING, A. Siderophore production and biofilm formation as linked social traits. **The ISME journal**, v. 3, p. 632–634, 2009.
- HOHNADEL, D.; MEYER, J. M. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. **Journal of bacteriology**, v. 170, p. 4865–4873, 1988.
- JUNG, M. Y. et al. Cutaneous *Mycobacterium massiliense* Infection of the Sole of the Feet. **Annals of dermatology**, v. 26, n. 1, p. 92–5, fev. 2014.
- KATOCH, V. M. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). **Indian J Med Res**, v. 120, n. 4, p. 290–304, 2004.
- KEATING, T. A.; MARSHALL, C. G.; WALSH, C. T. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. **Biochemistry**, v. 39, p. 15522–15530, 2000.
- KHAYATT, B. I. et al. Classification of the Adenylation and Acyl-Transferase Activity of NRPS and PKS Systems Using Ensembles of Substrate Specific Hidden Markov Models. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.
- KIEVIT, P.; LAUTEN, J. D.; MAURER, R. A. Analysis of the role of the mitogen-activated protein kinase in mediating cyclic-adenosine 3',5'-monophosphate effects on prolactin promoter activity. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 15, p. 614–624, 2001.
- KIM, B. et al. Identification of *Mycobacterial* Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). v. 37, n. 6, p. 1714–1720, 1999.
- KIM, H.-Y. et al. Outbreak of *Mycobacterium massiliense* infection associated with intramuscular injections. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3127–30, set. 2007.
- KIM, H.-Y. et al. Proportions of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* strains among Korean *Mycobacterium chelonae*-*Mycobacterium abscessus* group isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 10, p. 3384–90, out. 2008.
- KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 38, p. 61–88, 2003.

KOBASHI, Y. et al. Pulmonary Mycobacterium massiliense Disease with Septicemia during Immunosuppressive Treatment. **Internal Medicine**, v. 50, n. 9, p. 1069–1073, 2011.

KOHLI, R. M. et al. Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. **Biochemistry**, v. 40, p. 7099–7108, 2001.

KWON, S. O. et al. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical Acinetobacter baumannii isolate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, p. 150–156, 2009.

LAMONT, I. L. et al. Characterization of a gene encoding an acetylase required for pyoverdine synthesis in Pseudomonas aeruginosa. **Journal of bacteriology**, v. 188, p. 3149–3152, 2006.

LEAO, S. C. et al. Proposal that Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii be united and reclassified as Mycobacterium abscessus subsp. bolletii comb. nov., designation of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus subsp. nov. and emended description of Mycobacteri. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 61, n. Pt 9, p. 2311–3, set. 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001.

MADIGAN, C. A et al. Lipidomic discovery of deoxysiderophores reveals a revised mycobactin biosynthesis pathway in Mycobacterium tuberculosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 4, p. 1257–62, 24 jan. 2012.

MARMIESSE, M. et al. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial “core” genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the Mycobacterium tuberculosis complex Printed in Great Britain. p. 483–496, 2004.

MATZANKE, B. F. et al. Iron uptake and intracellular metal transfer in mycobacteria mediated by xenosiderophores. **BioMetals**, v. 10, p. 193–203, 1997.

MCMAHON, M. D. et al. Analyses of MbtB, MbtE, and MbtF Suggest Revisions to the. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 11, p. 2809–18, jun. 2012.

MIETHKE, M.; MARAHIEL, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 71, n. 3, p. 413–51, set. 2007.

MONEGO, A. F. et al. ORIGINAL Molecular identification and typing of Mycobacterium massiliense isolated from postsurgical infections in Brazil. p. 436–441, 2004.

NASH, K. A.; BROWN-ELLIOTT, B. A.; WALLACE, R. J. A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, p. 1367–1376, 2009.

OVES-COSTALES, D.; KADI, N.; CHALLIS, G. L. The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. **Chemical communications (Cambridge, England)**, p. 6530–6541, 2009.

PÉREZ-MIRANDA, S. et al. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. **Journal of microbiological methods**, v. 70, n. 1, p. 127–31, jul. 2007.

QUADRI, L. E. et al. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. **Chemistry & biology**, v. 5, n. 11, p. 631–45, nov. 1998.

QUADRI, L. E. N. MicroReview Assembly of aryl-capped siderophores by modular peptide synthetases and polyketide synthases. v. 37, 2000.

RAIOL, T. et al. **Complete Genome Sequence of *Mycobacterium massiliense*** **Journal of Bacteriology**, 2012.

RATLEDGE, C. Iron metabolism. **Blackwell Science**, p. 260–286, 1999.

RATLEDGE, C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 84, n. 1-2, p. 110–130, jan. 2004.

RATLEDGE, C.; DOVER, L. G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 54, p. 881–941, 2000.

REDDY, P. V. et al. Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 567–75, mar. 2012.

ROBERTS, A. A et al. Iron acquisition in the marine actinomycete genus *Salinispora* is controlled by the desferrioxamine family of siderophores. **FEMS microbiology letters**, v. 335, n. 2, p. 95–103, out. 2012.

RODRIGUEZ, G. M. et al. ideR , an Essential Gene in *Mycobacterium tuberculosis* : Role of IdeR in Iron-Dependent Gene Expression , Iron Metabolism , and Oxidative Stress Response †. v. 70, n. 7, p. 3371–3381, 2002.

RODRIGUEZ, G. M. Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 7, p. 320–327, jul. 2006.

RODRIGUEZ, G. M.; SMITH, I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. **Molecular microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1485–94, mar. 2003.

- SCHAIBLE, U. E.; KAUFMANN, S. H. E. Iron and microbial infection. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, p. 946–953, 2004.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, jan. 1987.
- SIMMON, K. E. et al. Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by *rpoB* sequencing of clinical isolates collected in the United States. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1978–80, jun. 2007.
- SNOW, G. A. Mycobactins: iron -chelating growth factors from mycobacteria. **Bacteriol. Rev.**, v. 34, p. 99–125, 1970.
- SPENCER, D. H. et al. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 185, p. 1316–1325, 2003.
- STINTZI, A. et al. Novel pyoverdine biosynthesis gene(s) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Microbiology**, v. 142 (Pt 5, p. 1181–1190, 1996.
- TULLIUS, M. V et al. Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. v. 108, n. 12, p. 5051–5056, 2011.
- VAN INGEN, J. et al. Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae*-abscessus group isolation in 95 patients. **Journal of Infection**, v. 59, p. 324–331, 2009.
- VAN SOOLINGEN, D. et al. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 32, p. 2425–2433, 1994.
- VIANA-NIERO, C. et al. Molecular Characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in Isolates Collected from Outbreaks of Infections after Laparoscopic Surgeries and Cosmetic Procedures □. v. 46, n. 3, p. 850–855, 2008.
- VOSS, J. J. DE et al. The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. v. 97, n. 3, 2000.
- VOSS, J. J. D. E. et al. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. **J Bacteriol**, v. 181, n. 15, p. 4443–51, 1999.
- WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annual review of microbiology**, v. 58, p. 611–647, 2004.
- WENCEWICZ, T. A. et al. **Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamine-antibiotic conjugates** **BioMetals**, 2009.
- WENDEL, S. O. et al. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to an Industrial Scale Medium and Isolation of the Mycobacterial Porin MspA. p. 92–98, 2013.

WEST, S. A.; BUCKLING, A. Cooperation, virulence and siderophore production in bacterial parasites. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, p. 37–44, 2003.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Current medicinal chemistry**, v. 11, p. 981–986, 2004.

WINKELMANN, G. **Ecology of siderophores with special reference to the fungi**BioMetals. **Anais...**2007

ZELAZNY, A. M. et al. Cohort Study of Molecular Identification and Typing of *Mycobacterium abscessus* , *Mycobacterium massiliense* , and *Mycobacterium bolletii* □. v. 47, n. 7, p. 1985–1995, 2009.

9 ANEXOS

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Anotado 1  -ATGGAAGCAATCAGTAGGGACGAGATCAAGCTGACGGTCGCCGACCTCATCGGGCTTACAGCCCAGGATATTTCCGGATG
Sequenc 1  -----GCGGTCGCCGACCTCATCGGGCTTACAGCCCAGGATATTTCCGGATG

      90      100     110     120     130     140     150     160
Anotado 80  GCGATGACCTCATCACACTCGGATTGGACTCGATCCGCATGATGACGCTGGCCGGTGGATGGCGCAAAACGGGGCAGCCGT
Sequenc 47  GCGATGACCTCATCACACTCGGATTGGACTCGATCCGCATGATGACGCTGGCCGGTGGATGGAGCAAAACGGGGCAGCCGT

      170     180     190     200     210     220     230     240
Anotado 160  GTCACCTTCGCTCAGCTGGCCGGCAGCCTTCGGTGGACTCCTGGTACGCGCTGCTGCGGGCGGATGATGAGGTGGCCCC
Sequenc 126  GTCACCTTCGCTCAGCTGGCCGGCAGCCTTCGGTGGACTCCTGGTACGCGCTGCTGCGGGCGGATGATGAGGTGGCCCC

      250     260     270     280     290     300     310     320
Anotado 240  GGACGAGGAGGCCCTGGCGGACGAAGCAGATGGTCAGGACGGCGAGGACGGCCTTTCCCGTGGCCACCATGCAACACG
Sequenc 206  GGACGAGGAGGCCCTGGCGGACGAAGCAGATGGTCAGGACGGCGAGGACGGCCTTTCCCGTGGCCACCATGCAACACG

      330     340     350     360     370     380     390     400
Anotado 320  CGTACTGGATCGGCCGATCGGAGGATCAGGAGCTCGGTGGGGTAGCGGCACACCTGTACTCGAATTCCAGCGGAGGACCA
Sequenc 286  CGTACTGGATCGGCCGATCGGAGGATCAGGAGCTCGGTGGGGTAGCGGCACACCTGTACTCGAATTCCAGCGGAGGACCA

      410     420     430     440     450     460     470     480
Anotado 400  ATCGATCCCAGCCACTCAAGGCTGGGGTAGAGGCTTGGTGGCCGCCATCCGATGTTAGCCACCAAGTTTCTGCCCG
Sequenc 365  ATCGATCCCAGCCACTCAAGGCTGGGGTAGAGGCTTGGTGGCCGCCATCCGATGTTAGCCACCAAGTTTCTGCCCG

      490     500     510     520     530     540     550     560
Anotado 479  ACGGCACACAGCAGACCATGGCGGCTCCCGGGCGGTGACGTGTTTACCCTGGTGGATCTCGCGGAACTGCGGGCCGG
Sequenc 442  ACGGCACAGCAGCAGACCATGGCGGCTCCCGGGCGGTGACGTGTTTACCCTGGTGGATCTCGCGGAACTGCGGGCCGG

      570     580     590     600     610     620     630     640
Anotado 555  CGAAGTCGACGCGCGCTTGCCGAACTGCGGGACACAAAGCCATCAGCGCTGGCCATAGAGGACGGGCAGGTGCTCG
Sequenc 515  -----

      650     660     670     680     690     700     710     720
Anotado 635  ACGTCAACGCTGACCTTGCGTGTATGACAACAAACAGCAGATTGCATCTCGACGTCGACATGCTTCCCGGCAACGCGATGAGC
Sequenc 515  -----

      730     740     750     760     770     780     790     800
Anotado 715  TACCGGATCTTGATATCTGATTTGGCAGCGCTCTATCAGGTTGGCGGCAACCTGAAATGGGATATTTCCACCGGGCGTA
Sequenc 515  -----TGGCAACGCTCTATCAGGTTGGCGGCAACCTGAAATGGGATATTTCCACCGGGCGTA

      810     820     830     840     850     860     870     880
Anotado 795  CCGCACCGAGGATCGTGGCGATGCGGCCGCACAGAGCGTGACAGGCAATGGTGGCAGGACAGGCTGGCCGGACCTGCCGG
Sequenc 573  CCGCACCGAGGATCGTGGCGATGCGGCCGCACAGAGCGTGACAGGCAATGGTGGCAGGACAGGCTGGCCGGACCTGCCGG

      890     900     910     920     930     940     950     960
Anotado 875  GTGCTCCGGAATGCCGGTTGTTCCGGTGGCGGAACGGCCGATCAACACCGCAACCGTCCGGTACAACTACTGGCTTGAA
Sequenc 653  GTGCTCCGGAATGCCGGTTGTTCCGGTGGCGGAACGGCCGATCAACACCGCAACCGTCCGGTACAACTACTGGCTTGAA

      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
Anotado 955  CCTGAGGCCAAGCAGCAGCTGCTGGTGGCCGCCACCAGCGGGCATCACCCCGCCATGGCGATGGCCGCTGTCTTCGC
Sequenc 733  CCTGAGGCCAAGCAGCAGCTGCTGGTGGCCGCCACCAGCGGGCATCACCCCGCCATGGCGATGGCCGCTGTCTTCGC

      1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
Anotado 1035  GGAAACCATCGCCGGTGGTCCGGCAGAGCCGATTCCTGTTGAAATGTCCTCCCTATTTTCATCGCGAGCCGGTGCATCCCG
Sequenc 813  GGAAACCATCGCCGGTGGTCCGGCAGAGCCGATTCCTGTTGAAATGTCCTCCCTATTTTCATCGCGAGCCGGTGCATCCCG

      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
Anotado 1115  ATATAGATCGGGTGTATCGGCGACTTCACCTCCTCGATCATGTCGACGTCGACCTGACCGAGGACATGTGGGTGGCTGAC
Sequenc 893  ATATAGATCGGGTGTATCGGCGACTTCACCTCCTCGATCATGTCGACGTCGACCTGACCGAGGACATGTGGGTGGCTGAC

```

```

      1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
Anotado 1195 C G G G C C C G T G C G T T G C A G C G C A C C A T G T A T G A G A G C G G G G C G C A C T C G G G T A C C C G G G A T T G A A C G T G T G C G C G A C C T
Sequenc  973   C G G G C C C G T G C G T T G C A G C G C A C C A T G T A T G A G A G C G G G G C G C A C T C G G G T A C C C G G G A T T G A A C G T G T G C G C G A C C T

      1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
Anotado 1275 G G G T A G G C A C C G G G C G A A C C G G T G C T G G G C C G A T C G T G T A C A C C A G C G C G T G A A T C T G G G G A A C T G T T C G C C G A G C
Sequenc 1053   G G G T A G G C A C C G G G C G A A C C G G T G C T G G G C C G A T C G T G T A C A C C A G C G C G T G A A T C T G G G G A A C T G T T C G C C G A G C

      1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
Anotado 1355 C G G T C A T G C G G A C C T T C G G G A A C C G G T A T G G A T C A T C T C C C A G G G C C G C A G G T G C T A C T G G A C G C T A G G T C A C C G A G
Sequenc 1133   C G G T C A T G C G G A C C T T C G G G A A C C G G T A T G G A T C A T C T C C C A G G G C C G A G G T G C T A C T G G A C G C T A G G T C A C C G A G

      1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
Anotado 1435 G T G C G G G G A G G C T T G C T G T T G A A C T G G G A C G T T C G C G A A T C A G C T T C C G C A C G G C A T G T G G C C G C G A T G T T C G A G C G
Sequenc 1211   G T G C G G G G A G G C T T G C T G T T G A A C T G G G A C G T T C G C G A A T C A G C T T C C G C A C G G C A T G T G G C C G C G A T G T T C G A G C G

      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
Anotado 1515 G T A C A C C G A T G C G G T G G C C G C T T G T G C G G G G A G C G G A C G G T G G A A C C C G A T G C G G C C T G C G A C T G C C T G C C T C C C
Sequenc 1290   G T A C A C C G A T G C G G T G G C C G C T T G T G C G G G G A G C G G A C G G T G G A A C C C G A T G C G G C C T G C G A C T G C C T G C C T C C C

      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
Anotado 1595 A G G A A C A G G T A C G G C G C A C C G T C A A T G C G A C G G A T G G T C C G G T C A G C G G C C G G G A T T G C A T G A A G G C T T C T T C G G G T T C
Sequenc 1370   A G G A A C A G G T A C G G C G C A C C G T C A A T G C G A C G G A T G G T C C G G T C A G C G G C C G G G A T T G C A T G A A G G C T T C T T C G G G T T C

      1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
Anotado 1675 G C C G A G T C G A G C C C G G G A T G C C C G G G T G G T C T G G G T T T C G G C G A C G A G A C C G T G T G G T C C T A C C C G A T G T G G C
Sequenc 1450   G C C G A G T C G A G C C C G G G A T G C C C G G G T G G T C T G G G T T T C G G C G A C G A G A C C G T G T G G T C C T A C C C G A T G T G G C

      1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840
Anotado 1755 G C C C A G G C C C T G G C G G T G G C G G G C G C T G C G A G C G G C G G G T A C C C C G G C G A T T G C G T T G C C G T G C A G T T G C C C A
Sequenc 1530   G C C C A G G C C C T G G C G G T G G C G G G C G C T G C G A G C G G C G G G T A C C C C G G C G A T T G C G T T G C C G T G C A G T T G C C C A

      1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
Anotado 1835 A G G G G C C G A C C A G A T T C C T G C G G T G C T C G G T G T G C T G G C G G C C G C C A C G T A T G T A C C G A T C G G A T T C G A T C A G C C G
Sequenc 1610   A G G G G C C G A C C A G A T T C C T G C G G T G C T C G G T G T G C T G G C G G C C G C C A C G T A T G T A C C G A T C G G A T T C G A T C A G C C G

      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000
Anotado 1915 G C C C A G C G C C G C G G G G A T C C T T G A A A C C G G G G A A T C T C C G T G G C G T T G A C C A C C T C T G A C T C C G A T A T G C C A T T G A
Sequenc 1690   G C C C A G C G C C G C G G G G A T C C T T G A A A C C G G G G A A T C T C C G T G G C G T T G A C C A C C T C T G A C T C C G A T A T G C C A T T G A

      2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080
Anotado 1995 T C A T C T G T C G A T C G A C G C G G C C C G T C A A T A T C C G G A A C C G C T C C G G G A G C C G G T G C T G C C G G A T G C T T C G C A G A T C G C A T
Sequenc 1770   T C A T C T G T C G A T C G A C G C G G C C C G T C A A T A T C C G G A A C C G C T C C G G G A G C C G G T G C T G C C G G A T G C T T C G C A G A T C G C A T

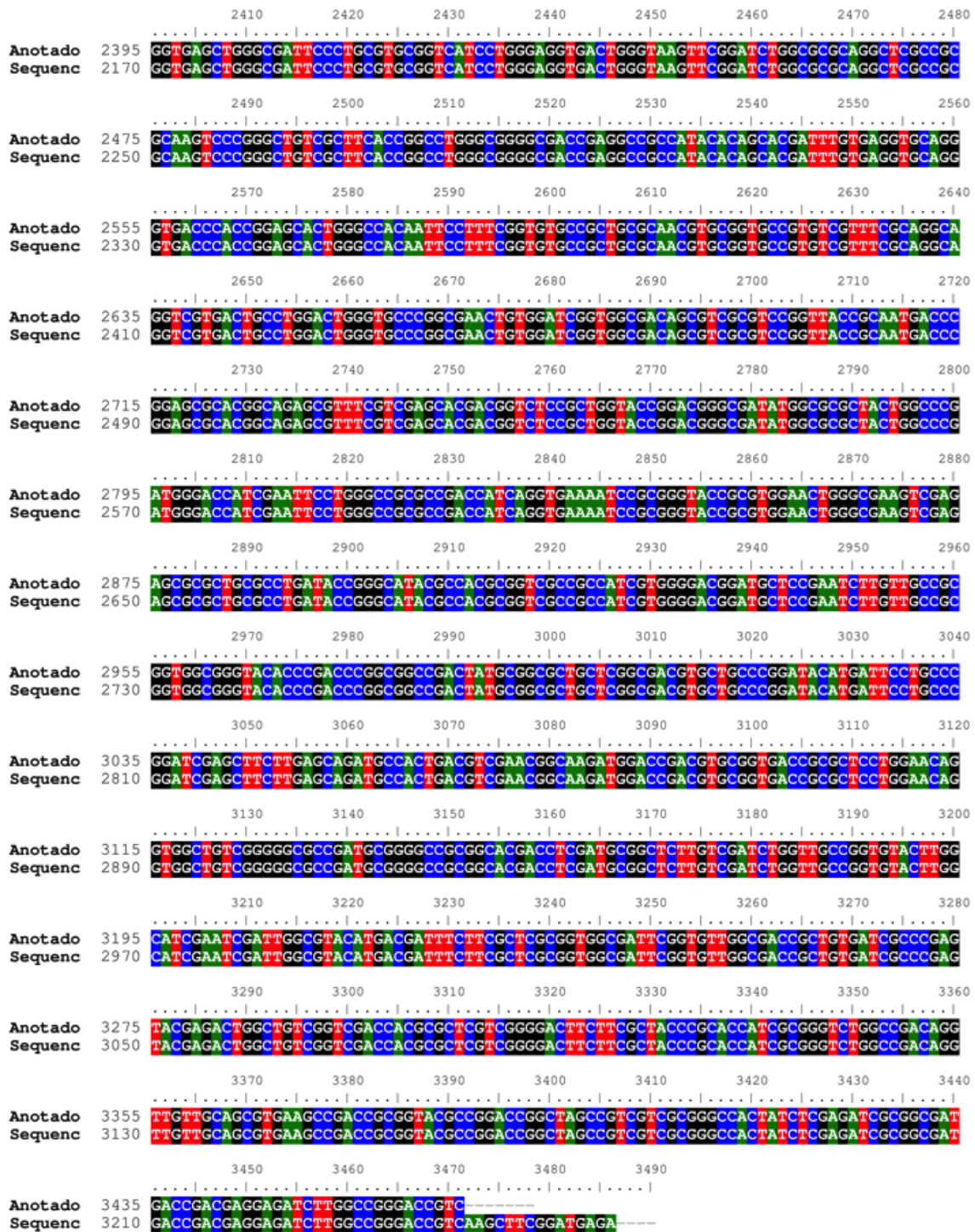
      2090      2100      2110      2120      2130      2140      2150      2160
Anotado 2075 A C G T C C T C T T C A C A T C G G G C T C T A C C G G A A C C C G A A G G G C G T C G A T G T C T C A C A T G C G G C C G C T A T G A A C A C A G A T T G A C
Sequenc 1850   A C G T C C T C T T C A C A T C G G G C T C T A C C G G A A C C C G A A G G G C G T C G A T G T C T C A C A T G C G G C C G C T A T G A A C A C A G A T T G A C

      2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240
Anotado 2155 G C T T T G A A C G A T G A G T T C G A A G T G G T C A C C T C G G A T C G T G C G C T C G G A C T G T C G G C C C T C G A T T C G A C T T G T C C G T A T A
Sequenc 1930   G C T T T G A A C G A T G A G T T C G A A G T G G T C A C C T C G G A T C G T G C G C T C G G A C T G T C G G C C C T C G A T T C G A C T T G T C C G T A T A

      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320
Anotado 2235 C G A C A T C T T C G G C A T G T T C T C T G T G C G G C C C G C G T G G T T G C G G T G G A T G C C G G C A G C G G G C C G A G G C C A C C A T G G G
Sequenc 2010   C G A C A T C T T C G G C A T G T T C T C T G T G C G G C C C G C G T G G T T G C G G T G G A T G C C G G C A G C G G G C C G A G G C C A C C A T G G G

      2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390      2400
Anotado 2315 T G G A A T T G A T A C G A C G C C A T A G G G T T T C G A T T A T C A A C T G T G T G C C C G G A C T G C T C G A C A T G A T T C T G G C A A T G G G C G G G
Sequenc 2090   T G G A A T T G A T A C G A C G C C A T A G G G T T T C G A T T A T C A A C T G T G T G C C C G G A C T G C T C G A C A T G A T T C T G G C A A T G G G C G G G

```



Cobertura resultante de cada primer

mbtb8_rev – 2882 a 3487pb

mbtb9_fwd – 2847 a 3395pb

mbtb8_fwd – 2550 a 2916pb

mbtb6_rev – 2296 a 2678pb

mbtb6_fwd – 1828 a 2300pb

mbtb4_rev – 1513 a 2116pb

mbtb5_fwd – 1456 a 1928pb

mbtb4_fwd – 1121 a 1456pb

myco_fwd – 744 a 1167pb

mbtb_fwd – 35 a 556pb



PROTOCOLO
Nº 001/07

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO

I – Identificação

- Título do projeto: Caracterização Molecular e Patogênica de *Mycobactéria* Atípicas – *Mycobacterium abscessus* – Isoladas na Cidade de Goiânia – Go.

- Pesquisador Responsável: ANDRÉ KIPNIS

Participantes: Ana Paula Kipnis – IPTSP/UFG.

Sueli Lemes de A. Alves – LACEN

Loanda C. Santana Limongi – Técnica, CNPq – UFG.

Alessandra Marques Cardoso – IPTSP/UFG.

Ediane Batista da Silva – EV – UFG.

Rafael Costa Vieira – EV – UFG.

Eduardo Martins de Souza – IPTSP/UFG.

Bruna Daniella de Souza Silva – PIBIC – UFG.

Hernane Bahia Fernandes – PIBIC – UFG.

- Instituição onde será realizado: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
- Data de apresentação ao COEP: 04.01.2007

II – Objetivos

- Padronizar um protocolo para extração de DNA e identificação molecular *Mycobacterium abscessus*.
- Estabelecer uma possível correlação genética entre os isolados clínicos *Mycobacterium abscessus* obtidos em diferentes laboratórios e hospitais Goiânia.